

Die Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I: Eine Struktur- und Funktions-Analyse

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von Dipl. Biol. Katja Wagenführ

geb. am 15.07.1979 in Wernigerode

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h. c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Detlev H. Krüger

2. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linnewerber

3. Prof. Dr. Peter Friedhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2009

Zusammenfassung

EcoP15I gehört zu den heterooligomeren Typ III Restriktionsendonukleasen. Der multifunktionale Enzymkomplex ist aus zwei Modifikations- und zwei Restriktions-Untereinheiten aufgebaut und katalysiert sowohl die Spaltung als auch die Methylierung der DNA. Für die effektive Spaltung der doppelsträngigen DNA benötigt EcoP15I zwei invers orientierte Erkennungsorte mit der DNA-Sequenz 5'-CAGCAG. Die Spaltung erfolgt im oberen Strang 24 bis 26 Basen in 3'-Richtung nach dem Erkennungsort und im unteren Strang 26 bis 28 Basen in 5'-Richtung nach dem Erkennungsort. Aufgrund des bislang größten definierten Abstandes zwischen Erkennungs- und Spaltort ist EcoP15I ein wichtiges Werkzeug in der funktionellen Genomanalyse. Die Aufklärung der Domänenstruktur beider EcoP15I-Untereinheiten durch limitierte Proteolyse zeigte, dass die Restriktions-Untereinheit modular aufgebaut ist. Sie besteht aus zwei stabil gefalteten Domänen, der N-terminalen Translokase- und der C-terminalen Endonuklease-Domäne. Beide Domänen sind durch einen flexiblen Linker verbunden. In der Modifikations-Untereinheit dagegen wurden keine Domänen identifiziert. Durch Insertion von Aminosäuren in und um den Linkerbereich konnten Enzymmutanten hergestellt werden, die bevorzugt die Positionen mit größten Abstand zum Erkennungsort spalteten. Wurden dagegen in dieser Region Aminosäuren deletiert, verloren die Enzymmutanten ihre DNA-Spaltaktivität. Die photochemische Vernetzung von EcoP15I mit spezifischer DNA ergab, dass EcoP15I drei Kontakte zum Phosphatrückgrat des ersten Adenins im Erkennungsort ausbildet. Ein Kontakt wird dabei über die Aminosäure S635 im C-terminalen Teil der Modifikations-Untereinheit hergestellt, zwei weitere entstehen durch die Aminosäuren Y248 und K421 der Restriktions-Untereinheit. Die transmissionselektronenmikroskopische Abbildung des negativ kontrastierten EcoP15I-Enzym zeigte einen symmetrischen Aufbau und stellt somit eine Grundlage für die Entwicklung eines dreidimensionalen Modells dar.

EcoP15I Restriktionsendonuklease, DNA Restriktion, Domänenstruktur, DNA-Protein-Interaktion, photochemische Vernetzung

Abstract

EcoP15I belongs to the hetero-oligomeric type III restriction endonucleases. The multifunctional enzyme complex consists of two modification and two restriction subunits and catalyses both the cleavage and methylation of the DNA. For effective cleavage of the double stranded DNA EcoP15I needs two inversely oriented recognition sites with the DNA sequence 5'-CAGCAG. The cleavage occurs 24 to 25 bases in 3'-direction from the recognition sequence in the top strand and 26 to 28 bases in 5'-direction from the recognition sequence in the bottom strand. Because of the largest known distance between recognition and cleavage site so far EcoP15I is an important tool in functional genomics. The elucidation of the domain structure of EcoP15I restriction as well as the modification subunit by limited proteolysis showed that the restriction subunit has a modular structure. It consists of two stable folded domains, the N-terminal translocase domain and the C-terminal endonuclease domain. Both domains are connected by a flexible linker. In contrast to the restriction subunit no domains could be detected in the modification subunit. Enzyme mutants that were constructed by insertion of amino acids in and around the linker region cleaved preferentially the position with the largest distance between recognition and cleavage site. The enzyme mutants lost their DNA cleavage activity when the amino acids in this region were deleted. The photochemical crosslinking of EcoP15I with specific DNA showed that EcoP15I forms three contacts to the phosphate backbone of the first adenine of the recognition site. One contact is made by amino acid S635 in the C-terminal part of the modification subunit. Two others are made by amino acids Y248 and K421 of the restriction subunit. The transmission electron microscope picture of the negatively stained EcoP15I enzyme showed a symmetric form and therefore it constitutes a basis for the development of a three dimensional model.

EcoP15I restriction endonuclease, DNA restriction, structural domains, DNA-protein interaction, photochemical crosslinking

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	2
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 Restriktions-/ Modifikationssysteme	7
1.1.1 Typ I Restriktionsendonukleasen.....	8
1.1.2 Typ II Restriktionsendonukleasen.....	9
1.1.3 Typ III Restriktionsendonukleasen.....	10
1.1.4 Typ IV Restriktionsendonukleasen	10
1.2 Die Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I	11
1.3 Protein-Engineering von Enzymen in Abhängigkeit von der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur	16
2 ERGEBNISSE	20
2.1 Die limitierte Proteolyse von EcoP15I zur Identifizierung struktureller Domänen in beiden Untereinheiten	20
2.1.1 Einfluss von DNA auf den proteolytischen Abbau der beiden Untereinheiten von EcoP15I.....	20
2.1.2 Der Einfluss von spezifischer und unspezifischer DNA in An- und Abwesenheit des Kofaktors ATP auf den proteolytischen Abbau der beiden EcoP15I-Untereinheiten.....	22
2.1.3 Massenspektrometrische Identifizierung der tryptischen Peptidfragmente	23
2.2 Protein-Engineering von EcoP15I	26
2.2.1 Mutagenese von EcoP15I.....	26
2.2.2 Ermittlung des exakten Spaltortes von EcoP15I an DNA-Substraten mit unterschiedlicher Konstellation der Erkennungsorte.....	29
2.2.3 Funktionelle Charakterisierung der EcoP15I-Mutanten	32
2.2.4 Spaltortbestimmung der EcoP15I-Mutanten	38
2.3 Photochemische Vernetzung von EcoP15I mit spezifischer DNA zur Identifizierung der DNA-Protein-Interaktionsstelle(n).....	41
2.3.1 Photochemische Vernetzung von EcoP15I mit basensubstituierter Oligonukleotid-Duplexen	42
2.3.2 Photochemische Vernetzung von EcoP15I mit Phosphatrückgrat-modifizierten Oligonukleotid-Duplexen.....	44
2.4 Elektronenmikroskopische Darstellung von EcoP15I.....	54
3 DISKUSSION	58
3.1 Der strukturelle Aufbau der beiden Untereinheiten der Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I	58
3.2 Eine potentielle Stelle der Protein-Protein-Interaktion zwischen beiden Untereinheiten von EcoP15I	62

3.3	DNA-Protein-Interaktion von EcoP15I mit spezifischer DNA.....	63
3.4	Protein-Engineering von EcoP15I	67
3.5	Elektronenmikroskopische Darstellung des Enzymkomplexes EcoP15I... 71	
3.6	Ausblick.....	71
4	MATERIAL UND METHODEN	73
4.1	Oligonukleotide.....	73
4.1.1	PCR-Primer	73
4.1.2	Sequenzierprimer	74
4.1.3	Modifizierte und nicht-modifizierte Oligonukleotide	74
4.2	Plasmide	75
4.3	Genexpression und Proteinreinigung.....	76
4.4	Chemikalien.....	76
4.5	Puffer.....	77
4.6	Limitierte Proteolyse von EcoP15I	77
4.7	Präparation der proteolytischen Fragmente und Massenspektrometrie	78
4.8	Insertionsmutagenese.....	79
4.9	Spaltortbestimmung von EcoP15I und Mutanten	80
4.10	Test der Methylierungsaktivität	81
4.11	Test der DNA-Spaltaktivität	81
4.12	Kolorimetrischer ATPase-Assay.....	81
4.13	Gel-Shift Experimente	82
4.14	Photochemisches Vernetzen von EcoP15I und DNA	83
4.14.1	Photochemisches Vernetzen von EcoP15I mit basensubstituierter DNA ...	83
4.14.2	Photochemisches Vernetzen von EcoP15I mit Phosphatrückgrat-modifizierter DNA und Aufarbeitung des Peptid-DNA-Komplexes	84
4.14.3	Mutagenese der putativen Interaktionsstellen	85
4.15	Elektronenmikroskopische Darstellung von EcoP15I.....	85
	LITERATUR.....	87
	ABKÜRZUNGEN.....	94
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	95
	TABELLENVERZEICHNIS.....	96

DANKSAGUNG.....	97
EIGENE PUBLIKATIONEN ZUM THEMA	98
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	99

1 EINLEITUNG

1.1 Restriktions-/ Modifikationssysteme

Das Phänomen der Restriktion und Modifikation wurde in den frühen fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts beobachtet und beschrieben [1]. Es konnte gezeigt werden, dass sich Bakteriophagen gut auf einem Bakterienstamm vermehrten, wenn sie zuvor auch auf diesem gewachsen waren. Eine Bakteriophagenpopulation, die vorher auf einem anderen Stamm gewachsen war, vermehrte sich bedeutend schlechter [2]. Die weitere Untersuchung dieser Beobachtungen führte schließlich zur Entdeckung der Restriktions- und Modifikationssysteme (R/M-Systeme) [3,4]. Die R/M-Systeme sind in prokaryotischen Organismen weit verbreitet. Sie sind chromosomal, viral oder von Plasmiden kodiert. Bakterienzellen, die ein solches R/M-System besitzen, sind vor Eindringung von Fremd-Desoxyribonukleinsäure (DNA) geschützt. Die R/M-Systeme sind normalerweise aus zwei funktionell kooperierenden Proteinen einer Restriktionsendonuklease und einer DNA-Methyltransferase aufgebaut. Die Enzyme eines Systems erkennen dieselbe spezifische Sequenz auf der DNA. Die Restriktionsendonuklease katalysiert die Spaltung der doppelsträngigen DNA. Die Methyltransferase dagegen überträgt eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf eine Base des Erkennungsortes. SAM ist somit ein essentieller Kofaktor für die Methylierung. Es werden verschiedene Methylierungspositionen benutzt, nach denen auch die Methyltransferasen eingeteilt werden: das N⁴- oder das C⁵-Atom eines Cytosins oder das N⁶-Atom eines Adenins [5]. Bei symmetrischen Sequenzen wird die gleiche Base in beiden Strängen methyliert. Die Restriktionsendonuklease bindet üblicherweise nicht an einen methylierten DNA-Erkennungsort. Zellfremde DNA, die nicht spezifisch methyliert ist, kann demzufolge durch die Restriktionsendonuklease gespalten werden. Aufgrund des spezifischen Methylierungsmusters wird zwischen zelleigener und zellfremder DNA unterschieden.

Restriktionsendonukleasen werden basierend auf ihrer Zusammensetzung aus Untereinheiten, DNA-Sequenz des Erkennungsortes, Kofaktor-Anforderung und Spaltposition in vier große Gruppen unterteilt [6].

1.1.1 Typ I Restriktionsendonukleasen

Typ I Restriktionsendonukleasen sind komplexe, oligomere Proteine, die aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind: der Erkennungsuntereinheit HsdS (engl.: S – *host specificity of DNA, specificity*), der Methylierungsuntereinheit HsdM (M – *methylation* oder *modification*) und der Restriktionsuntereinheit HsdR (R – *restriction*) [1,7]. *In vivo* können zwei aktive oligomere Enzymkomplexe gefunden werden. Die Form M_2S besteht aus zwei Methylierungs- und einer Erkennungsuntereinheit. Sie stellt eine aktive Methyltransferase dar, die in Anwesenheit von Magnesiumionen (Mg^{2+}) und SAM die Übertragung der Methylgruppe auf ein Adenin des Erkennungsortes katalysiert. Eine zweite Form, bestehend aus R_2M_2S , bildet die aktive Restriktionsendonuklease, die unmethylierte DNA an einer zufälligen Stelle mit großem Abstand zum Erkennungsort spalten kann [7,8]. Zur Spaltung ist zusätzlich zu Mg^{2+} und SAM der Kofaktor ATP notwendig. Die Typ I Restriktionsendonukleasen besitzen neben der Methylierungs- und Restriktionsaktivität eine DNA-abhängige ATPase- und eine DNA-Translokase-Aktivität [9].

Die HsdS-Untereinheit erkennt den spezifischen DNA-Erkennungsort des Enzyms und dient als Kernuntereinheit, an welche die anderen Untereinheiten binden. Am Beispiel des Erkennungsortes der Typ I Restriktionsendonuklease EcoKI AACN₆GTGC (N = beliebige Base) wird deutlich, dass dieser asymmetrisch und aus zwei Teilen aufgebaut ist: 3 bis 4 spezifische Basenpaare am 5'-Teil sind durch 6 bis 8 nicht-spezifische Basenpaare von dem 4 bis 5 bp langen Erkennungsort am 3'-Teil getrennt [10]. Lineare DNA kann nur in Anwesenheit von mindestens zwei Erkennungsorten geschnitten werden. Zirkuläre DNA hingegen kann effizient gespalten werden, wenn nur ein Ort vorhanden ist [11]. HsdS enthält zwei DNA-Erkennungsdomänen (*target recognition domain*, TRD), die N-terminale TRD erkennt dabei den 5' gelegenen Erkennungsort und die C-terminale TRD den 3' gelegenen Erkennungsort [10].

Die HsdM-Untereinheit ist für die Bindung des Kofaktors SAM, die Erkennung des Methylierungsstatus und die Methylierung der Adeninbase zuständig. Im oberen Strang befindet sich das methylierte Adenin im 5'-Bereich, im unteren Strang im 3'-Bereich des Erkennungsortes. Ist die DNA nur in einem Strang methyliert (hemimethylierte DNA), dient sie als Substrat der Methyltransferase und es erfolgt die sofortige Methylierung des unmethylierten Adenins [10].

Zwei HsdR-Untereinheiten komplettieren den Methyltransferase-Komplex (M_2S_1) zu einer funktionsfähigen Restriktionsendonuklease, die unmethylierte Erkennungsorte

spalten kann. Limitierte Proteolyse, Sequenz- und Mutationsanalysen von EcoKI [12] und EcoAI [13] konnten zeigen, dass die HsdR-Untereinheit aus verschiedenen Domänen aufgebaut ist. Nahe dem N-Terminus befindet sich die Domäne mit dem Endonuklease-Motiv PDX_n(D/E)XK. Eine C-terminale Domäne vermittelt offensichtlich den Kontakt zum Kern der Methyltransferase. Die HsdR-Untereinheiten aller Typ I Restriktionsendonukleasen enthalten die sieben konservierten DEAD-Box Aminosäure-Motive, die von putativen DNA- und RNA-Helikasen bekannt sind [14]. Sie sind an der ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und DNA-Translokation beteiligt.

1.1.2 Typ II Restriktionsendonukleasen

Die Typ II R/M-Systeme setzen sich aus zwei separaten Enzymen für die DNA-Restriktion und die DNA-Methylierung zusammen. Beide Enzyme erkennen die gleiche DNA-Sequenz unabhängig voneinander. Der Erkennungsort ist 4 bis 8 bp lang und überwiegend palindromisch. Die Spaltung erfolgt an einem definierten Ort innerhalb oder nahe des Erkennungsortes. Als Kofaktor ist in der Regel Mg²⁺ notwendig. Die Restriktionsendonuklease BfiI ist das bislang einzige bekannte Enzym, dass die DNA Metallionen-unabhängig spalten kann [15]. Die Typ II Restriktionsendonukleasen agieren unabhängig von der korrespondierenden Methyltransferase als Monomer, Dimer oder sogar Tetramer. Die Methyltransferase kommt gewöhnlich als Monomer vor und überträgt eine Methylgruppe von Methyl donor SAM auf ein Adenin oder Cytosin des Erkennungsortes [6]. Aufgrund unterschiedlicher Kofaktoranforderungen, Lage des Spaltortes in Bezug auf den Erkennungsort und des oligomeren Status werden die Typ II Restriktionsenzyme in elf verschiedene Subtypen unterteilt [6].

Die Primärsequenzen der Typ II Restriktionsenzyme weisen nur geringe oder gar keine Sequenzhomologien auf, selbst wenn sie die gleiche DNA-Sequenz erkennen. Der Vergleich der 28 bisher bekannten Kristallstrukturen der Typ II Restriktionsenzyme zeigt allerdings, dass diese Enzyme ein ähnliches Kernmotiv besitzen, welches das aktive Zentrum enthält und somit als wichtiger Struktur-Stabilisierungsfaktor dient [16]. Das Kernmotiv besteht aus vier konservierten β -Faltblättern und einer α -Helix [17].

Aufgrund der hohen Sequenzspezifität, des definierten Spaltortes und der getrennten Nutzung von Methyltransferase und Restriktionsendonuklease finden die Typ II Restriktionsenzyme ein breites Anwendungsspektrum als Werkzeuge innerhalb der Molekularbiologie.

1.1.3 Typ III Restriktionsendonukleasen

Typ III Restriktionsendonukleasen sind multifunktionale, heterooligomere Enzymkomplexe, die sowohl Methylierungs- als auch Restriktionsaktivität besitzen [1]. Sie sind aus zwei Untereinheiten, der Restriktions-Untereinheit (Res-Untereinheit) und der Modifikations-Untereinheit (Mod-Untereinheit) aufgebaut. Die Mod-Untereinheit ist für die spezifische DNA-Erkennung und die Methylierung einer bestimmten Base des DNA-Erkennungsortes zuständig. Sie kann unabhängig von der Res-Untereinheit als Dimer agieren. Die Res-Untereinheit ist für die Spaltung von unmethylierter doppelsträngiger DNA notwendig und ist nur in Kooperation mit der Mod-Untereinheit funktionsfähig [1]. Die am besten charakterisierten Enzyme dieser Gruppe sind EcoPI und EcoP15I [8,10]. Beide Enzyme sind eng miteinander verwandt, ihre Res-Untereinheiten sind nahezu identisch [18,19]. Andere Enzyme dieser Gruppe sind weniger gut erforscht. Dazu gehören HinfIII [20], HinfI [21], StyLTI [22,23], LlaFI [24], BceSI [25], PhaBI [26] und PstII [27,28]. Da die in dieser Arbeit näher untersuchte Restriktionsendonuklease EcoP15I zu den Typ III Restriktionsendonukleasen gehört, wird auf diese Enzyme im Kapitel 1.2 näher eingegangen.

1.1.4 Typ IV Restriktionsendonukleasen

Typ IV Restriktionsenzyme erkennen und schneiden modifizierte DNA. Sie gehören nicht zu einem R/M-System, da eine korrespondierende Methyltransferase fehlt. Die Modifikation kann eine Methylierung, Hydroxymethylierung oder Glukosyl-Hydroxymethylierung sein [6]. Das biochemisch und genetisch am besten untersuchte Enzym dieser Klasse ist EcoKMcrBC, welches aus zwei Untereinheiten besteht. McrB ist für die DNA-Erkennung und McrC für die DNA-Spaltung verantwortlich. Das Enzym erkennt zwei Dinukleotide der Form RmC (ein Purin gefolgt vom einem methylierten Cytosin). Beide Dinukleotide können 40 bis 3000 Basen voneinander getrennt sein. Die Spaltung erfolgt ungefähr 30 bp von einem der beiden Erkennungsorte entfernt und ist GTP- und Mg^{2+} -abhängig [10].

1.2 Die Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I

Der heterooligomere Enzymkomplex EcoP15I ist aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Die Mod-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 77 kDa ist in dimerer Form als Methyltransferase enzymatisch aktiv [29,30,31] und erkennt den spezifischen DNA-Erkennungsort. Die Res-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 115 kDa katalysiert in Kooperation mit der Mod-Untereinheit im Verhältnis Mod_2Res_2 ($M_{\text{EcoP15I}} = 407 \text{ kDa}$) die Spaltung der doppelsträngigen DNA [31]. Für die Spaltung sind ATP und Mg^{2+} notwendig. Für die Methylierungsreaktion benötigt das Enzym SAM als Methyl donor und Mg^{2+} [32]. Die zusätzliche Anwesenheit von ATP führt zu einer erhöhten Diskriminierung zwischen spezifischer und unspezifischer DNA [30].

Die Restriktionsendonuklease EcoP15I erkennt die asymmetrische DNA-Sequenz 5'-CAGCAG. Zur effektiven Spaltung der unmethylierten DNA sind zwei Erkennungsorte in inverser Orientierung notwendig, die bis zu 3500 bp voneinander entfernt liegen können [33]. Aufgrund der Asymmetrie sind die beiden Einzelstränge des Erkennungsortes nicht identisch. Als A-Strang wird dabei der Einzelstrang bezeichnet, der die Sequenz 5'-CAGCAG enthält. Der T-Strang dagegen enthält die Sequenz 5'-CTGCTG. Die Orientierung der Erkennungsorte geht immer vom A-Strang aus, das 5'-Ende wird als Schwanz und das 3'-Ende als Kopf bezeichnet. EcoP15I spaltet die DNA im A-Strang 25 oder 26 Basen in 3'-Richtung nach dem Erkennungsort und im T-Strang 27 oder 28 Basen in 5'-Richtung nach dem Erkennungsort [31,34].

Die EcoP15I Methyltransferase überträgt eine Methylgruppe auf das zweite Adenin des Erkennungsortes in Anwesenheit von SAM als Methyl donor und Mg^{2+} [35]. Im Gegensatz zur Spaltung ist für eine effektive Methylierung des Adenins im Erkennungsort keine bestimmte Anzahl oder Orientierung der Erkennungsorte notwendig. Die Mod-Untereinheit enthält mehrere funktionelle Motive (Abbildung 1). Wie alle Methyltransferasen, die eine Methylgruppe auf Adenin in der Position N^6 übertragen, besitzt auch die Mod-Untereinheit von EcoP15I die hoch konservierten Motive FxGxG (Motiv I) und DPPY (Motiv IV). Das Motiv I (AS 444 bis 448) stellt die SAM-Bindungsstelle dar, Motiv IV (AS 125 bis 128) ist an der Katalyse beteiligt [36]. Durch Mutationsanalysen konnte festgestellt werden, dass die Position G448 essentiell für die Methylierungsaktivität ist. Die DNA-Sequenzerkennung blieb davon unbeeinflusst [36]. Die Mutation des Tyrosins zu Tryptophan im Motiv IV zeigte einen Verlust der enzymatischen Aktivität, jedoch die Bindung von SAM und DNA blieb unverändert [36]. Das Cystein an Position 344 ist für die enzymatische Aktivität von

EcoP15I notwendig, da es eine essentielle Rolle bei der DNA-Bindung spielt [37]. Die Aminosäuren 559 bis 603 konstituieren das DXDXD Motiv, welches in verschiedenen Calcium-bindenden Proteinen entdeckt wurde [32]. Für die Methylierungsreaktion benötigt EcoP15I Mg^{2+} . Ein Magnesium-Bindungsmotiv zwischen den AS 355 und 377 konnte durch Mutationsanalysen identifiziert werden. Besonders die sauren Aminosäure-Reste in diesem Bereich sind für die korrekte Positionierung des Mg^{2+} von großer Bedeutung [32]. Der Histidinrest an der Position 335 spielt offensichtlich eine essentielle Rolle bei der DNA-Methylierung. Wird es gegen Alanin ausgetauscht, entsteht ein Enzym, dass zwar eine stärkere DNA-Bindung als das Wildtypenzym aufweist, aber katalytisch inaktiv ist [38].

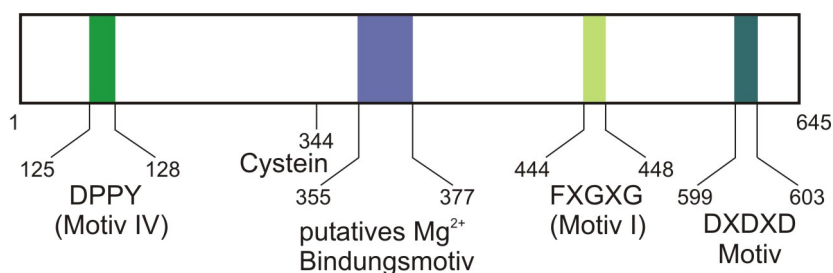


Abbildung 1: Schematische Darstellung der putativen funktionellen Motive in der EcoP15I Mod-Untereinheit.

Die zwei hoch konservierten Motive, die typischerweise bei N^6 -Methyltransferasen vorkommen, Motiv I (FXGXG) und Motiv IV (DPPY), sind in grün dargestellt. Die blauen Balken repräsentieren die Metallbindungsmotive für Mg^{2+} (zwischen AS 355 und 377) und Ca^{2+} (zwischen AS 599 und 603), (modifizierte Abbildung aus [32]).

Anhand struktureller Analysen verschiedener Typ II Restriktionsenzyme weiß man, dass die Sequenz $PDX_n(D/E)XK$ ($n = 1$ bis 30 AS) als katalytisches Zentrum oder Mg^{2+} -Bindungsmotiv agiert [39]. Der Vergleich der Aminosäuresequenz der EcoP15I Methyltransferase mit anderen Restriktionsenzymen zeigte einen Bereich, der homolog zu der Sequenz $PDX_n(D/E)XK$ ist. In der EcoP15I Sequenz ist dabei das partiell konservierte Prolin durch Methionin ersetzt. Wird durch ortsspezifische Mutagenese das Methionin mit Prolin substituiert, entsteht aus der EcoP15I Methyltransferase eine spezifische Endonuklease [40]. Genau wie das EcoP15I Wildtypenzym erkennt die genetisch veränderte EcoP15I Methyltransferase den Erkennungsort 5'-CAGCAG. Die Spaltung erfolgt asymmetrisch, zehn Nukleotide in 3'-Richtung des Erkennungsortes im oberen Strang und direkt am Beginn des Erkennungsortes im unteren Strang. Im Gegensatz zum EcoP15I Wildtypenzym erfolgt keine ATP-Hydrolyse. Für die effiziente Spaltung von zirkulärer DNA benötigt das veränderte Enzym nur einen 5'-CAGCAG Erkennungsort. Lineare DNA dagegen kann unabhängig von der Anzahl und Konstellation der Erkennungsorte nicht gespalten werden. Aufgrund dessen

spekulieren die Autoren, dass der Vorgang der DNA-Spaltung durch dieses Enzym abhängig von der Topologie der DNA ist.

Die EcoP15I Res-Untereinheit enthält mehrere konservierte Motive, die typischerweise in Helikasen der Superfamilie 2 (SF2) vorkommen [14]. Eine spezifische Helikase-Aktivität für EcoP15I konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden. Die minimale biochemische Funktion, die durch den katalytischen Kern der SF2 Helikasen festgelegt ist, ist möglicherweise eine ATP-abhängige, gerichtete Translokation entlang doppelsträngiger DNA [41].

EcoP15I benötigt für eine effiziente Spaltung zwei asymmetrische 5'-CAGCAG Erkennungsorte, die invers zueinander orientiert sind [33]. Von diesen Erkennungsorten aus bewegen sich die Enzyme durch unidirektionale DNA-Translokation und unter ATP-Hydrolyse aufeinander zu [42]. Die dabei entstehenden DNA-Schlaufen konnten bereits mittels Rasterkraftelektronenmikroskopie dargestellt werden. Eine Basis der beobachteten Schlaufen war dabei spezifisch an einem der beiden EcoP15I Erkennungsorte lokalisiert. Die zweite Basis befand sich an einer unspezifischen Stelle zwischen beiden Erkennungsorten [43]. Mit Hilfe einer weiterentwickelten Methode, der *fast-scan atomic force microscopy*, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden [44]. Die Translokationsgeschwindigkeit von EcoP15I beträgt dabei 79 ± 33 bp/s [44]. Aus ihren Ergebnissen schlussfolgern die Autoren, dass EcoP15I zwei unterschiedliche Mechanismen benutzt, um zwischen voneinander entfernten DNA-Erkennungsorten zu kommunizieren: eine DNA-Schlaufenbildung über Diffusion und eine ATP-abhängige DNA-Translokation. Die Kombination beider Prozesse könnte eine Erklärung dafür sein, warum Typ III Restriktionsenzyme trotz relativ geringer ATP-Hydrolyse dennoch große Distanzen zwischen den Erkennungsorten überwinden können.

EcoP15I katalysiert nur eine endonukleolytische Spaltung der DNA und bleibt danach am DNA-Erkennungsort gebunden [45]. Es existieren verschiedene Modelle, die den Vorgang der DNA-Spaltung beschreiben. Das Kollisionsmodell besagt, dass je ein EcoP15I-Molekül an einen der Erkennungsorte bindet (Abbildung 2, oben). Die distal gebundene Res-Untereinheit transloziert die DNA in 3'-Richtung durch das gesamte Protein (Abbildung 2, Schlaufen S2 und S4). Die dazu notwendige Energie wird durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Die Schlaufe S3 (Abbildung 2) wird durch eine fortlaufende Translokation der DNA kleiner, solange bis die Res-Untereinheiten aneinander stoßen. Nach der Kollision beider Enzymkomplexe kommt es vermutlich zu

einer Konformationsänderung, wodurch anschließend die Spaltung ausgelöst wird (Abbildung 2, unten rechts). Ein zweites Reaktionsmodell beschreibt, dass nach der Bindung der Enzymkomplexe an den Erkennungsort nicht die DNA transloziert wird, sondern das Protein sich auf der DNA entlang bewegt. Die Spaltung an sich wird anschließend ebenfalls durch Kollision beider Enzymkomplexe ausgelöst [46].

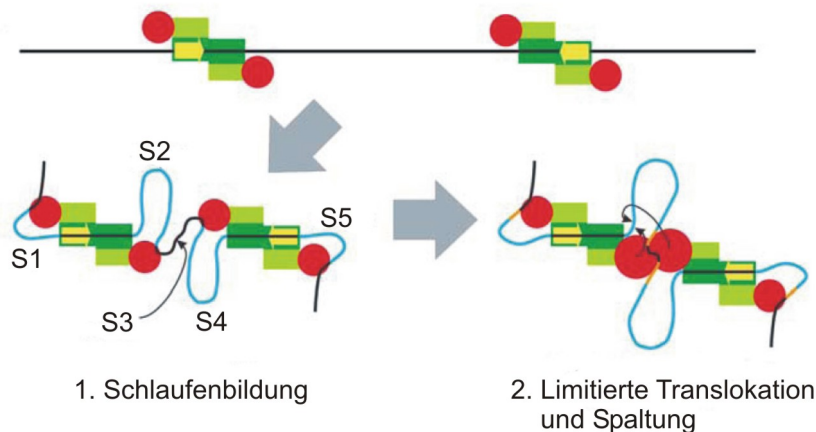


Abbildung 2: Modell der Spaltung zweier invers zueinander orientierter EcoP15I Erkennungsorte.

Das obere Bild zeigt die doppelsträngige DNA (schwarz), die beiden EcoP15I Erkennungsorte sind als gelbe Pfeile dargestellt. Die Res-Untereinheiten sind als rote Kreise, die Mod-Untereinheit als grüne Vierecke gekennzeichnet. Zusätzlich dazu wird die Mod-Untereinheit in die Methylierungsdomäne (hellgrün) und in die Erkennungsdomäne (dunkelgrün) unterteilt. In den unteren Bildern ist die DNA, die aufgrund der Translokation Schleifen (S1 bis S5) ausbildet, hellblau eingefärbt. Die orangefarbene DNA kennzeichnet eine limitierte Translokation (modifizierte Abbildung aus [47]).

EcoP15I spaltet die DNA in einem definierten Abstand zum Erkennungsort. Die Entfernung von 26 bis 28 bp ist der größte Abstand, den man bislang zwischen Erkennungs- und Spaltort von Restriktionsendonukleasen kennt. Durch diese besonderen Eigenschaften kann EcoP15I als Werkzeug in angewandten molekularen Analyseverfahren und der medizinischen Diagnostik eingesetzt werden. Die autosomal-dominant vererbte Krankheit Chorea Huntington (engl. Huntington's disease) zeichnet sich durch eine erhöhte Anzahl an CAG-Wiederholungen im ersten Exon des HD-Gens auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 aus. Bei der Proteinsynthese kommt es zur Bildung von Polyglutaminketten, die Auslöser für neurodegenerative Erkrankungen sind. Die Anzahl der CAG-Wiederholungen gibt eine Aussage über das Erkrankungsrisiko der Patienten. Zwei dieser Wiederholungen entsprechen einem EcoP15I Erkennungsort. Durch Spaltung der DNA mit EcoP15I und quantitativer Auswertung des Spaltmusters kann eine genaue Anzahl an CAG-Wiederholungen bestimmt werden [48].

Die Transkriptomanalyse mittels SuperSAGE (engl.: *serial analysis of gene expression*) konnte durch den Einsatz von EcoP15I (als Restriktionsendonuklease mit dem größten definierten Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort auf der DNA) in ihrer Genauigkeit und Zuverlässigkeit verbessert werden [49,50]. Sie beruht auf der Generierung so genannter Tags, die cDNA-Umschreibungen der entsprechenden mRNAs repräsentieren (Abbildung 3). Die resultierende Länge der Tags beträgt durch die Spaltung mit EcoP15I 26 bp. Die Tags werden anschließend kloniert, sequenziert, in ihrer Häufigkeit quantifiziert und zu den kodierenden Genen annotiert. Das Genexpressionsprofil ergibt sich aus der Zusammenstellung aller annotierten Gene und der Häufigkeit ihrer Transkripte in der Zelle [51].

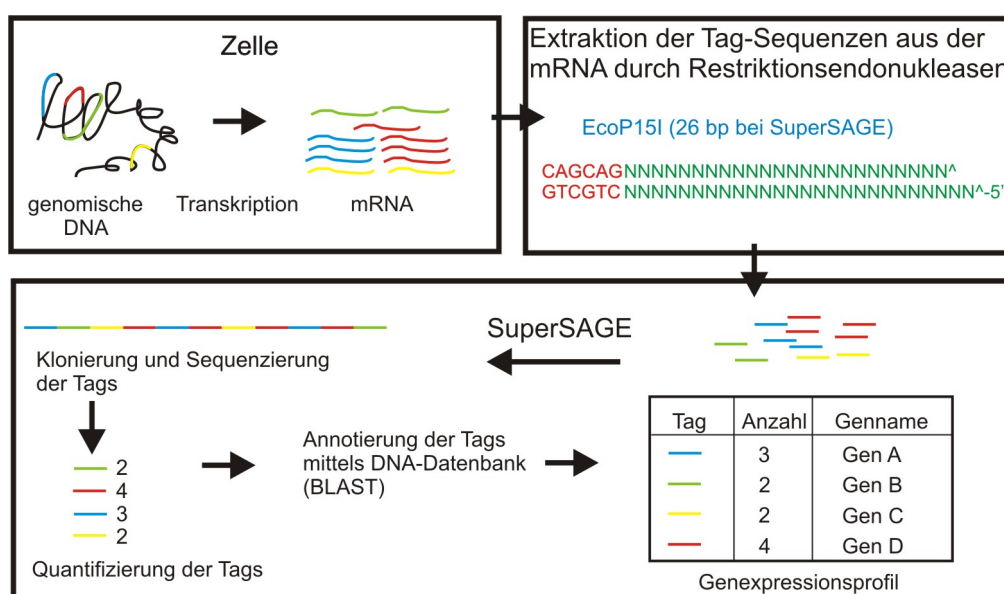


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Transkriptomanalyse mittels SuperSAGE.

Von jedem in cDNA umgeschriebenen mRNA-Transkript in der Zelle werden 26 bp lange Fragmente (Tags) durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease EcoP15I generiert. Die Tags werden kloniert und sequenziert. Nach Quantifizierung und Annotierung der Tags ergibt sich daraus das Genexpressionsprofil der Zelle (modifizierte Abbildung aus [51]).

Durch den Einsatz von EcoP15I konnte die Tag-Länge von 14 bp (durch Spaltung mit der Typ II Restriktionsendonuklease BsmFI) auf 26 bp vergrößert werden. Die Zuordnung der Tags zu den entsprechenden Genen ist somit deutlich verbessert worden. Durch eine weitere Vergrößerung des Abstandes zwischen Erkennungs- und Spaltort kann das Verfahren nur noch geringfügig optimiert werden. Die mit der SuperSAGE verbundene Anwendungen würden allerdings von einer vergrößerten Tag-Länge profitieren. Die Tag-Sequenzen könnten direkt als Primer für die 3' bzw. 5' RACE (engl.: *rapid amplification of cDNA ends*) zur Aufklärung der Nukleotidsequenz annotierter Gene, als Hybridisierungs sonden in SuperSAGE-Arrays, sowie als siRNAs

(engl.: *small interfering RNA*) in der SuperSAGE-RNAi (RNA-Interferenz) genutzt werden [51,52].

1.3 Protein-Engineering von Enzymen in Abhängigkeit von der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur

DNA-prozessierende Enzyme, wie zum Beispiel Polymerasen, Restriktionsendonukleasen oder Methyltransferasen werden oft als Werkzeuge in der Molekularbiologie oder Gentherapie verwendet. Die Anwendbarkeit insbesondere der Restriktionsendonukleasen wird jedoch oft durch die DNA-Sequenz ihres spezifischen Erkennungsortes limitiert. Durch Protein-Engineering können neue Restriktionsendonukleasen generiert werden, die zum Beispiel eine veränderte DNA-Sequenz erkennen, eine erhöhte DNA-Spaltaktivität oder verbesserte Stabilität besitzen.

Protein-Engineering von Enzymen kann mit Hilfe zweier Methoden durchgeführt werden: die gerichtete Evolution oder das rationelle Engineering [53]. Für die Strategie der gerichteten Evolution sind Informationen, wie sich die Enzymstruktur auf dessen Funktion auswirkt, nicht notwendig [54]. Es werden mehrere Zyklen einer speziellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *error prone PCR*) durchlaufen, die an zufälligen Stellen Mutationen in die gesamte Gensequenz eines Enzyms einführt. Auf diese Weise entstehen Bibliotheken mit mutagenisierten Genen, die anschließend auf die gewünschte neue Eigenschaft untersucht werden können. Ebenso können auch neue, zusätzliche Eigenschaften auftreten, die ebenfalls von Nutzen sind. Bei Restriktionsendonukleasen führen Mutationen überwiegend zu einer verringerten katalytischen Aktivität der Enzyme, die auf der starken funktionellen Verknüpfung von DNA-Erkennung und -Spaltung beruhen. Da nach Mutation der Interaktionsstellen zwischen Enzym und DNA unter Umständen nicht alle notwendigen spezifischen Kontakte ausgebildet werden können, zeigt sich dies in einer Verminderung der Effizienz der DNA-Spaltung. Für die Strategie des zielgerichteten oder rationellen Engineerings sind strukturelle und biochemische Daten von hoher Bedeutung. Nur anhand der Kenntnis der genauen Interaktionsstellen zwischen Enzym und DNA ist es möglich, den potentiellen Bereich der Mutation einzugrenzen.

Restriktionsendonukleasen erkennen ihren spezifischen DNA-Erkennungsort sehr genau und spalten die doppelsträngige DNA an definierten Positionen. Alternative oder auch verlängerte Erkennungs- und Spaltorte sind zum Beispiel für diagnostische oder

gentherapeutische Anwendungen in der Medizin von großem Interesse [55]. Die bisherigen Daten zeigen, dass die Veränderung der Eigenschaften der Enzyme schwierig, aber nicht unmöglich ist. Die erste verfügbare Kokristallstruktur eines DNA-bindenden Proteins an seinen Erkennungsort mit der Sequenz 5'-GAATTC war die homodimere Typ II Restriktionsendonuklease EcoRI [56]. Es zeigte sich, dass alle mit dem Erkennungsort in Kontakt stehenden Aminosäuren in räumlicher Nähe zueinander liegen und auf direkte oder indirekte Weise miteinander agieren. Ähnlich komplexe Wechselwirkungen sind auch in Kokristallstrukturen anderer Restriktionsendonukleasen zu finden [57]. Die Ergebnisse der Mutation aller einzelnen Aminosäuren, die in Kontakt mit dem DNA-Erkennungsort stehen, zeigte, dass es zu einer starken Verminderung der katalytischen Aktivität kommen kann, jedoch nicht zu einer Änderung der Spezifität der Restriktionsendonuklease [58].

Nicht immer führen Mutationen zu einer Verringerung der DNA-Spaltaktivität. Die EcoRI Mutante I197A zeigt eine fünfmal höhere spezifische Aktivität als der Wildtyp. Diese Aminosäure ist nicht an der DNA-Bindung beteiligt, spielt aber scheinbar eine wichtige Rolle beim strukturellen Aufbau des Enzyms [59]. Die BamHI Mutante C54A [60] und HindIII Mutante E86K [61] besitzen ebenfalls eine erhöhte Spaltaktivität. Die Ergebnisse beweisen, dass die durch eine Mutation verursachte Verringerung der Spaltaktivität von Restriktionsenzymen auch wieder gesteigert werden kann.

Ein großes Potential für das Protein-Engineering besitzen die Homing Endonukleasen. Diese Enzyme sind durch Sequenzen kodiert, die in selbst-spleißenden RNA-Introns oder selbst-spleißenden Protein-Introns (Inteins) gefunden werden können. Homing Endonukleasen werden aufgrund konservierter Sequenz-Motive in vier Gruppen unterteilt. Dies sind die LAGLIDADG-, GIY-YIG-, H-N-H- und die His-Cys-Box-Familien [6]. Homing Endonukleasen haben einen ungewöhnlich langen, aber spezifischen DNA-Erkennungsort. Diese Eigenschaft wird zum Beispiel genutzt, um „Designer“ Enzyme zu entwickeln, die bestimmte Sequenzen in krankhaften Allelen aus dem humanen Genom heraus schneiden. Durch zufällige Mutagenese der an dem 22 bp langen Erkennungsort bindenden Aminosäuren der Homing Endonuklease I-CreI konnten Seligman *et al.* [62] Mutanten generieren, die eine veränderte Spezifität in der DNA-Erkennung und -Spaltung zeigten. Durch weitere Protein-Engineering-Versuche stellten Arnould *et al.* [63] ein Enzym her, das Sequenzen eines krankhaften humanen Gens spalten kann und somit eine effiziente Genkorrektur in Säugerzellen induziert. Homing Endonukleasen bieten aufgrund ihres modularen Aufbaus eine weitere Möglichkeit der Generierung von neuen Enzymen. Durch Austauschen der Domänen

der zwei Endonukleasen I-Dmol und I-Crel wurde ein hybrides Enzym geschaffen, welches auch die hybride DNA-Sequenz erkennt und schneidet [64]. Die Strategie der Mutagenese basierte in diesem Fall auf den bekannten Kristallstrukturen beider Homing Endonukleasen.

Diese Beispiele zeigen, dass ein Protein-Engineering meist nicht ohne strukturelle und funktionelle Daten des Zielobjektes durchführbar ist. Detailliertes Wissen über die dreidimensionale Struktur von biologischen Molekülen hat einen enormen Einfluss auf alle Bereiche der biologischen Forschung. Die Struktur eines Proteins bestimmt dessen Funktion, denn die Spezifität des aktiven Zentrums und der Bindungsstellen (zum Beispiel DNA-Bindungsstellen) hängt von deren präziser dreidimensionalen Konformation ab [65]. Es existieren verschiedene Möglichkeiten, eine dreidimensionale Struktur zu generieren. Die wohl bekannteste und erfolgreichste Methode ist die Röntgenkristallographie. Sie liefert bei der Visualisierung von Proteinstrukturen die höchste gegenwärtig verfügbare Auflösung und stellt die genaue räumliche Lage der meisten Atome in einem Proteinmolekül dar [65]. Mit der Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) lässt sich die atomare Struktur von Makromolekülen in Lösung ermitteln. Diese Methode eignet sich derzeit für Proteine mit einer maximalen Größe von ca. 40 kDa. Für große und komplexe Strukturen, wie zum Beispiel Viren, haben sich die (Kryo-) Elektronenmikroskopie und Elektronen(-Kryo)-Tomographie als Erfolg versprechende Methoden bewährt [66]. Als Kryo-Elektronenmikroskopie versteht man die Abbildung von Objekten in vitrifiziertem Eis mit einem Elektronenmikroskop. Die Probe befindet sich dabei in einer wässrigen Lösung und wird auf einen dünnen Kohlefilm aufgebracht. Anschließend wird die Probe in flüssiges Ethan geschossen, wodurch sie sich so schnell abkühlt, dass sich glasartiges Eis bildet. In diesem Eisfilm können die Proben unter fast physiologischen Bedingungen im Elektronenmikroskop abgebildet werden [67]. Da die Kontrastbildung nur auf der Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt beruhen, können nicht nur Konturen, sondern auch Elektronendichten rekonstruiert werden. Die Größe des Objektes ist dabei ein limitierender Faktor dieser Methode. Es sollte mindestens 200 kDa groß sein, da sonst die Informationen im Hintergrundrauschen verloren gehen. Um den Kontrast zu erhöhen, können Schwermetallsalze, zum Beispiel Uranylacetat, als Kontrastmittel eingesetzt werden. Ein Problem dabei ist jedoch, dass es durch Trocknen des Kontrastmittel-Films zum Abflachen der Probe kommen kann und somit eine Verfälschung der geometrischen Form des Objektes möglich ist.

Bislang sind laut der Datenbank REBASE nur 28 der mehr als 3500 bekannten Typ II Restriktionsendonukleasen kristallisiert. Vollständige Kristalle von Typ I Restriktionsendonukleasen sind nicht verfügbar. Lediglich die HsdS-Untereinheiten der Typ I Restriktionsendonukleasen aus *Methanococcus janaschii* [68] und *Mycoplasma genitalium* [69] konnten bisher aufgelöst werden. Von den bis heute bekannten Typ III Restriktionsendonukleasen existieren weder Kristallstrukturen noch andere strukturelle Daten.

Ein sinnvolles Protein-Engineering kann nur anhand struktureller Daten erfolgen. In der vorliegenden Arbeit werden erste Untersuchungen an der Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus vorgestellt. Diese daraus gewonnenen Erkenntnisse werden im weiteren Verlauf in die Entwicklung einer Mutagenese-strategie einbezogen. Ebenso werden erste vorläufige Daten, die zu einem dreidimensionalen Modell von EcoP15I führen sollen, gezeigt. Die Arbeit stellt somit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Struktur und Funktion des heterooligomeren Enzymkomplex dar.

2 ERGEBNISSE

2.1 Die limitierte Proteolyse von EcoP15I zur Identifizierung struktureller Domänen in beiden Untereinheiten

2.1.1 Einfluss von DNA auf den proteolytischen Abbau der beiden Untereinheiten von EcoP15I

Die Methode der limitierten Proteolyse bietet die Möglichkeit, funktionelle Domänen in einem Protein zu identifizieren. Beim zeitlich begrenzten Einsatz einer Protease sind stabil gefaltete Bereiche innerhalb eines Proteins schwerer zugänglich als unstrukturierte Bereiche, wie zum Beispiel Schlaufen oder Verbindungsregionen. Die stabil gefalteten Bereiche können über den Zeitraum der Proteolyse angereichert und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden. Zunächst wurde EcoP15I für unterschiedlich lange Zeiträume mit Trypsin in Anwesenheit von Kofaktor ATP und in An- bzw. Abwesenheit von spezifischer DNA verdaut. Der hier benutzte DNA-Duplex war 60 bp lang und enthielt zwei EcoP15I-Erkennungsorte in inverser Orientierung. Um eine mögliche Spaltung des DNA-Duplexes zu unterbinden, wurde der Kofaktor Magnesium gegen Calcium ausgetauscht. Die Ergebnisse der limitierten Proteolyse von EcoP15I mit Trypsin sind in der Abbildung 4 dargestellt.

Die tryptischen Abbauprodukte wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die Fragmente 1 und 2 in der Abbildung 4 repräsentieren jeweils die unverdaute Res-Untereinheit, mit einem molekularen Gewicht von 115,4 kDa, und die Mod-Untereinheit mit 77 kDa [31]. Die Banden 3 bis 11 zeigen die Fragmente, die durch den Verdau mit Trypsin entstanden. In Abwesenheit von spezifischer DNA bildeten sich fünf verschiedene Abbauprodukte (Banden 3 bis 7, Abbildung 4), in Anwesenheit von DNA dagegen zeigten sich nur vier Abbauprodukte (Banden 8 bis 11, Abbildung 4), die ein ungefähres molekulares Gewicht zwischen 80 und 20 kDa aufwiesen. Die Res-Untereinheit wurde in Abwesenheit von spezifischer DNA sofort in zwei Fragmente von ca. 80 kDa (Bande 5, Abbildung 4) und 30 kDa (Bande 7, Abbildung 4) gespalten. Zusätzlich konnte eine sehr feine Bande mit einer Größe von ca. 62 kDa (Bande 6) detektiert werden. Die beiden Fragmente der Banden 5 und 7

waren über den hier untersuchten Zeitraum von 2,5 Stunden stabil. Auch in Anwesenheit von spezifischer DNA konnte das Entstehen dieser Fragmente beobachtet werden (Banden 9 und 11). Außerdem erschien unter diesen Versuchsbedingungen eine schwache Bande mit einer Größe von 62 kDa (Bande 10). Im Gegensatz zur Abwesenheit von DNA konnte in deren Anwesenheit ein zeitlich verlangsamter Abbau der Res-Untereinheit beobachtet werden.

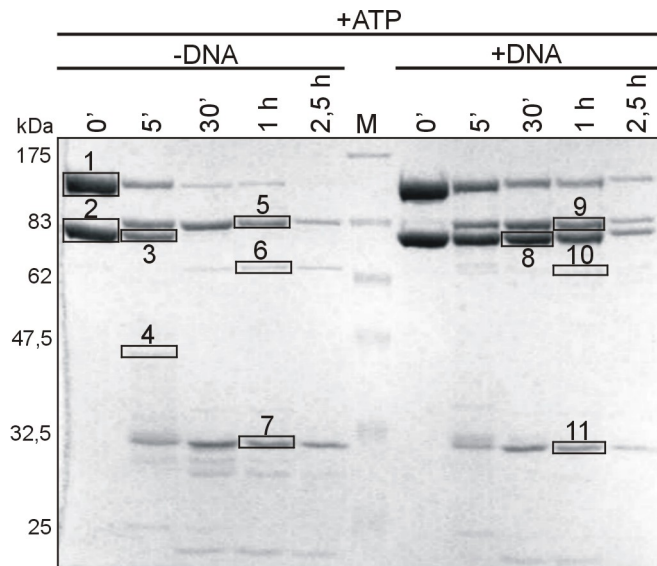


Abbildung 4: Tryptischer Verdau von EcoP15I in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von spezifischer DNA (60-2).

Die Dauer des tryptischen Verdaus ist über den Gelbahnen angegeben. Die Banden 1 und 2 repräsentieren die jeweils unverdaute Res- und Mod-Untereinheit von EcoP15I. In Abwesenheit von DNA entstanden durch den Verdau mit Trypsin fünf Abbauprodukte (Banden 3 bis 7), in Anwesenheit von DNA vier Abbauprodukte (Banden 8 bis 11). M Molekulargewichtsmarker (Prestained Broad Range Proteinmarker, New England Biolabs). Die Molekulargewichte sind links neben dem Bild angegeben.

Die Mod-Untereinheit (Bande 2) wurde in Abwesenheit von spezifischer DNA sehr schnell degradiert. Innerhalb eines Zeitraums von fünf bis 30 Minuten baute Trypsin sie vollständig ab (vgl. Abbildung 3, Bande 3). Im Gegensatz dazu konnte die Mod-Untereinheit in Anwesenheit von spezifischer DNA über fast den gesamten Zeitraum vor proteolytischen Abbau geschützt werden (vgl. Abbildung 3, Bande 8).

Die limitierte Proteolyse in Abwesenheit von spezifischer DNA zeigte, dass beide Untereinheiten relativ schnell durch Trypsin abgebaut werden konnten. Im Gegensatz dazu blieb die Mod-Untereinheit in Anwesenheit von DNA sehr lange stabil (bis zu 2,5 Stunden). Die Res-Untereinheit zeigte einen zeitlich verlangsamten Abbau durch Trypsin in zwei stabile Domänen.

2.1.2 Der Einfluss von spezifischer und unspezifischer DNA in An- und Abwesenheit des Kofaktors ATP auf den proteolytischen Abbau der beiden EcoP15I-Untereinheiten

Ein zweites Experiment sollte klären, welchen Einfluss der Kofaktor ATP auf den proteolytischen Abbau von EcoP15I hat. Hierzu wurden drei unterschiedliche DNA-Duplexe benutzt: der unspezifische DNA-Duplex 60-0 (60 bp Länge, kein EcoP15I-Erkennungsort) und die zwei spezifischen DNA-Duplexe 60-1 (60 bp Länge, ein EcoP15I-Erkennungsort) und 75-2 (75 bp Länge, zwei EcoP15I-Erkennungsorte in inverser Orientierung). EcoP15I wurde nach Inkubation mit oder ohne ATP und den DNA-Duplexen für eine Stunde mit Trypsin verdaut. Die tryptischen Fragmente wurden mit Hilfe der SDS-PAGE entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (Abbildung 5).

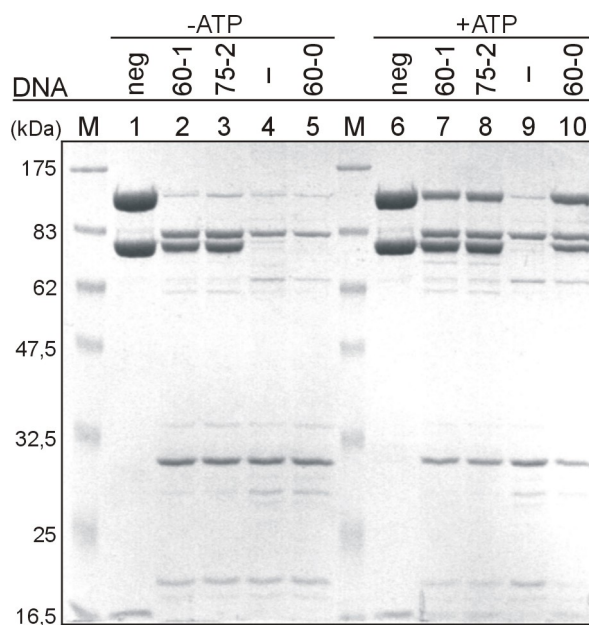


Abbildung 5: Einfluss von Kofaktor ATP auf den tryptischen Verdau von EcoP15I in An- und Abwesenheit spezifischer und unspezifischer DNA-Substrate.

Die Dauer der Proteolyse betrug bei allen Proben eine Stunde. Bahnen 1 und 6, unverdautes EcoP15I (Negativkontrolle); Bahnen 2, 3, 7 und 8, tryptischer Verdau von EcoP15I in Anwesenheit von spezifischer DNA mit einem (60-1) und zwei Erkennungsorten (75-2); Bahnen 4 und 9, tryptischer Verdau von EcoP15I in Abwesenheit von DNA; Bahnen 5 und 10, tryptischer Verdau von EcoP15I in Anwesenheit von unspezifischer DNA (60-0). M Molekulargewichtsmarker (Prestained Broad Range Proteinmarker, New England Biolabs). Die Molekulargewichte sind links neben dem Bild angegeben.

Befand sich kein ATP im Proteolyseansatz, wurde die Mod-Untereinheit immer dann vor tryptischen Abbau geschützt, wenn spezifische DNA vorhanden war (Bahnen 2 und 3, Abbildung 5).

Die Abwesenheit von DNA sowie die Anwesenheit unspezifischer DNA führten zum tryptischen Abbau der Mod-Untereinheit (Bahnen 4 und 5, Abbildung 5). Befanden sich ATP und DNA im Proteolyseansatz, wurde die Mod-Untereinheit geschützt, unabhängig von der Spezifität der DNA. Spezifische DNA konnte dabei die Mod-Untereinheit geringfügig besser vor Abbau schützen als unspezifische DNA (vgl. Bahnen 7, 8 und 9, Abbildung 5).

Die Res-Untereinheit wurde in Abwesenheit von ATP unter allen getesteten Versuchsbedingungen proteolytisch abgebaut (Bahnen 2 bis 5, Abbildung 5). Im Gegensatz zur Mod-Untereinheit bot die Anwesenheit von spezifischer DNA keinen Schutz vor Abbau. Nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP und DNA (spezifisch oder unspezifisch) war die Res-Untereinheit in Kontakt mit DNA und konnte somit stabile Strukturen ausbilden (Bahnen 7 bis 10, Abbildung 5). Wie auch im Zeitverlaufsexperiment (Abbildung 3) zu sehen war, entstanden beim proteolytischen Verdau der Res-Untereinheit zwei stabile Abbauprodukte mit einer Größe von ca. 80 kDa und 30 kDa.

Dieses Experiment zeigte, dass sowohl die Mod- als auch die Res-Untereinheit bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP und DNA (spezifisch oder unspezifisch) vor tryptischen Abbau geschützt wurde. In Abwesenheit von ATP konnte spezifische DNA die Mod-Untereinheit schützen, die Res-Untereinheit allerdings wurde rasch degradiert. Trypsin spaltete sie in zwei stabile Fragmente mit einem Molekulargewicht von ungefähr 80 kDa und 30 kDa.

2.1.3 Massenspektrometrische Identifizierung der tryptischen Peptidfragmente

Die beiden vorherigen Proteolyse-Experimente haben gezeigt, dass sich unter speziellen Versuchsbedingungen stabile Peptidfragmente ansammeln. Um diese stabilen Strukturen den entsprechenden Bereichen in der Primärsequenz von EcoP15I zuordnen zu können, sollte ihre Aminosäuresequenz identifiziert werden. Hierzu wurden die entsprechenden Banden (siehe Abbildung 4) aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnitten und die Peptide eluiert. Die Identifizierung erfolgte anhand zwei verschiedener massenspektrometrischen Methoden. Die Kombination aus Flüssigkeitschromatographie / Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (LC / ESI-MS) und Matrix-basierter Laser Desorptionsmassenspektrometrie (MALDI-MS) boten

eine höhere Wahrscheinlichkeit, die Aminosäuresequenz der eingesetzten Peptide exakt zu identifizieren. Die unverdauten Untereinheiten wurden als Kontrollen miteinbezogen, um zu prüfen, ob die Methode *per se* auf die EcoP15I Restriktionsendonuklease anwendbar ist. Die hohen Sequenzabdeckungsraten von 78 % für die Res-Untereinheit und 62 % für die Mod-Untereinheit haben gezeigt, dass die in der limitierten Proteolyse angereicherten putativen Domänen somit durch Massenspektrometrie identifiziert werden können. In Abbildung 6 sind die ermittelten Peptidfragmente zusammengefasst.

Die Fragmente 5 und 9 haben eine errechnete Masse von 77 bis 79 kDa. Sie waren unter allen getesteten Bedingungen, jedoch hauptsächlich in Anwesenheit von ATP und DNA, zu finden. Sie wurden dem N-terminalen Teil der Res-Untereinheit zwischen den Aminosäuren 40 und 705 zugeordnet. Die Fragmente 6 und 10, die unter denselben Bedingungen entstanden, konnten als N-terminal verkürzte Versionen der Fragmente 5 und 9 bestimmt werden. Fragment 6 entsprach dabei dem Bereich zwischen den Aminosäuren 237 und 705, das Fragment 10 zwischen den Aminosäuren 180 und 705. Die Fragmente 7 und 11 wurden dem C-terminalen Teil zwischen den Aminosäuren 729 und 966 zugeordnet.

Der Mod-Untereinheit hingegen konnte nur ein Abbauprodukt zugewiesen werden (Fragment 4). Das nur transient aufgetretene Fragment entsprach der N-terminalen Sequenz zwischen den Aminosäuren 3 und 337. Unter bestimmten Versuchsbedingungen (Vorhandensein von spezifischer DNA oder Vorhandensein von ATP und DNA) wurde die Mod-Untereinheit fast in ihrer gesamten Länge vor tryptischen Abbau geschützt (Fragmente 3 und 8, Aminosäuren 3-643).

a) Fragment #	Molekulargewicht [kDa]	N-terminale Sequenz	EcoP15l-Peptid
-DNA			
(5)	77-79	LLANPELKLSEQ	L40-R705 Res
(6)	54-62	TWENSIEKFNAQY	T237-R705 Res
(7)	27-29	SIVSDDDDFAKL	S729-K966 Res
(4)	39-42	KETIFSEVETAN	K3-K337 Mod
(3)	74-77	KETIFSEVETAN	K3-R643 Mod
+DNA			
(9)	77-79	LLANPELKLSEQ	L40-R705 Res
(10)	60-62	YIHVLVINSBMI	Y180-R705 Res
(11)	27-29	SIVSDDDDFAKL	S729-K966 Res
(8)	74-77	KETIFSEVETAN	K3-R643 Mod

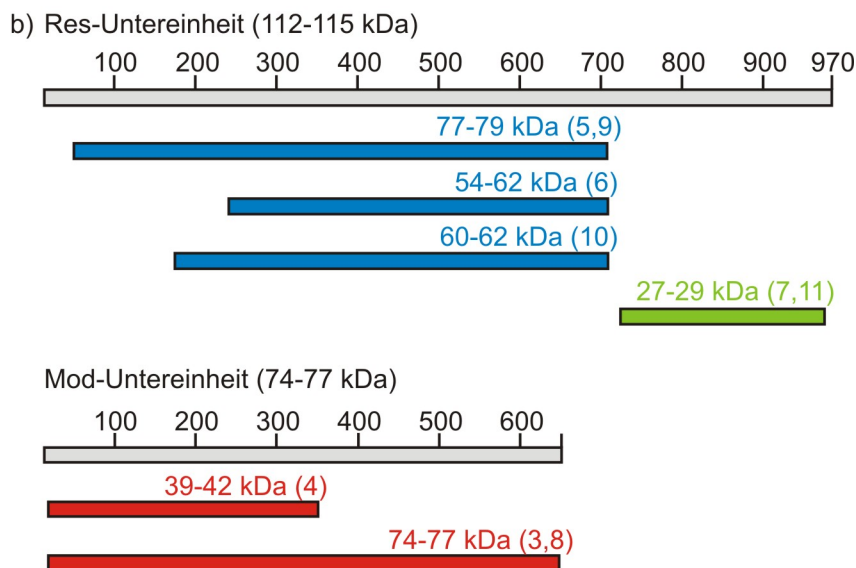


Abbildung 6: (a) Massenspektrometrische Identifikation der proteolytischen Fragmente und (b) grafische Darstellung ihrer Lage in der EcoP15l-Primärsequenz.

(a) Die molekularen Massen der Proteine und Proteinfragmente basieren auf den theoretischen und den aus denaturierenden Polyacrylamidgelen ermittelten Werte. (b) Die Balken repräsentieren die Länge der beiden Untereinheiten Res (970 Aminosäuren) und Mod (644 Aminosäuren), und der jeweils mit Hilfe der Massenspektrometrie identifizierten Fragmente. Die Farbkodierung der Balken korrespondiert mit den entsprechenden Peptiden unter (a).

Diese Ergebnisse führten zum Schluss, dass die EcoP15l Res-Untereinheit aus zwei stabil gefalteten Domänen aufgebaut ist: einer N-terminalen Domäne zwischen den Aminosäuren 40 und 705 und einer C-terminalen Domäne zwischen den Aminosäuren 729 und 966. Die N-terminale Domäne enthält mehrere putative funktionelle Motive der Superfamilie 2 Translokasen/Helikasen, die durch computergestützte Aminosäuresequenzvergleiche verschiedener Restriktionsendonukleasen identifiziert wurden [14,70]. Verkürzte Versionen dieser Domäne wurden als proteolytisches Zwischenprodukt betrachtet, da die sehr feinen Banden im SDS-Gel nur transient zu

sehen waren. Die C-terminale Domäne enthält das konservierte Motiv $PDX_n(D/E)XK$, welches als das endonukleolytische Motiv bezeichnet wird. Der Bereich zwischen den beiden Domänen, Aminosäure 706 bis 728, könnte dabei als mögliche Linkerregion fungieren. Der proteolytische Abbau der Mod-Untereinheit dagegen lieferte keine stabil gefaltete Domäne. In Abwesenheit von DNA wurde sie rasch durch Trypsin degradiert. Die Anwesenheit von ATP und DNA führte scheinbar zu einer konformationellen Änderung der Mod-Untereinheit, die sie in fast ihrer gesamten Größe (Aminosäuren 3 bis 643 von insgesamt 644) vor Abbau schützen konnte.

2.2 Protein-Engineering von EcoP15I

Die Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I spaltet doppelsträngige DNA im bislang größten definierten Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort. Der Einsatz von EcoP15I in der Transkriptomanalyse durch SuperSAGE vergrößerte die Länge der Tags von bisher 14 bp (durch Spaltung mit BsmFI) auf 26 bp. Für die anschließende exakte Annotierung der entsprechenden Gene ist die Länge der Sequenzen ausreichend. Weiterführende Analysen der SuperSAGE würden von Tag-Längen mit mehr als 26 bp Länge profitieren. Sie könnten zum Beispiel direkt als siRNAs in RNAi-Versuchen eingesetzt werden, um die Funktion der identifizierten Gene näher charakterisieren zu können. Demzufolge sollte durch ein Protein-Engineering von EcoP15I der Abstand zwischen dem Erkennungs- und Spaltort vergrößert werden.

2.2.1 Mutagenese von EcoP15I

Die Ergebnisse der limitierten Proteolyse von EcoP15 haben gezeigt, dass die Res-Untereinheit offensichtlich in zwei stabil gefaltete Domänen unterteilt ist. Beide Domänen sind durch einen 23 Aminosäuren langen, flexiblen Linker verbunden. Da die N-terminale Domäne funktionelle DNA-Bindungs-Motive und die C-terminale Domäne das katalytische Motiv $PDX_n(D/E)XK$ enthält, war zu vermuten, dass der putative Linkerbereich den Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort determiniert. Eine Sekundärstruktur-Vorhersage sollte klären, welchen strukturellen Charakter der Linkerbereich besitzt. Das Proteinsequenzanalyse-Netzwerk (engl.: *network protein sequence analysis*, NPS@) bietet dazu ein Berechnungsprogramm „*Secondary structure consensus prediction*“ an. Die Berechnung der möglichen Sekundärstruktur

basiert auf verschiedenen mathematischen Methoden. Den einzelnen Aminosäuren werden dabei Werte zugeordnet, die eine Aussage darüber machen, ob die betreffende Aminosäure eher in einer α -Helix oder einem β -Faltblatt vorkommt. Der Vorteil des Programms besteht darin, dass es alle Ergebnisse der verschiedenen Berechnungsmethoden berücksichtigt und anschließend eine Konsensussequenz ausgibt.

In der Abbildung 7 ist das Ergebnis der Sekundärstruktur-Vorhersage für die Aminosäuren 650 bis 750 der EcoP15I Res-Untereinheit grafisch dargestellt. Vor dem putativen Linkerbereich (vgl. Abbildung 7, gelber Balken) befand sich demzufolge eine α -helikale Struktur (vgl. Abbildung 7, blauer Balken). Zur räumlichen Trennung der Translokase- von der Endo-Domäne wurden in und um den Linkerbereich an den markierten Positionen in der Abbildung 7 Aminosäuren inseriert oder deletiert. Um die Ausbildung fehlerhafter Sekundär- und Tertiärstrukturen zu verringern, wurden möglichst vollständige α -Helix-Windungen eingefügt. Eine komplette Windung enthält 3,6 Aminosäuren. Dementsprechend wurden in den C-terminalen Teil der dem Linker vorgelagerten α -Helix eine (Ch4), zwei (Ch7), drei (Ch11), fünf (Ch18) und acht (Ch29) zusätzliche Windungen durch Verdopplung der dort bereits vorhandenen Aminosäuren hinzugefügt. Ebenso wurden eine (Nh4) und zwei (Nh7) Windungen in den N-terminalen Teil der α -Helix eingefügt. Da der Linker ein unstrukturierter Bereich zu sein scheint (vgl. Abbildung 7, gelber Balken), wurden hier verschiedene Verdopplungen der vorhandenen Aminosäuren eingeführt (L3, L10 und L23). In der Endo-Domäne wurde ein kleiner Bereich verdoppelt, für den eine kurze α -Helix vorausgesagt wurde (Endo4). Darüber hinaus sollte der Einfluss einer Verkürzung der α -Helix um eine (Δ Ch4) und zwei Windungen (Δ Ch7), sowie das Fehlen der kompletten Linkerregion (Δ L) auf die Enzymaktivität von EcoP15I untersucht werden.

Nach Genexpression und Proteinreinigung der EcoP15I Mutanten wurden diese nicht nur auf ihren Spaltort hin untersucht, sondern auch funktionell charakterisiert. Die DNA-Bindung, die Methylierungsaktivität, die DNA-Spaltaktivität und die ATPase-Aktivität waren hierbei von besonderem Interesse.

2.2.2 Ermittlung des exakten Spaltortes von EcoP15I an DNA-Substraten mit unterschiedlicher Konstellation der Erkennungsorte

Der aus der Literatur bekannte Spaltort des EcoP15I Wildtypenzym wird mit 25 oder 26 Basen in 3'-Richtung nach dem Erkennungsort im A-Strang und 27 oder 28 Basen in 5'-Richtung nach dem Erkennungsort im T-Strang angegeben. Um einen möglichen Einfluss der Insertionen und Deletionen in der EcoP15I Primärsequenz auf den Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort überprüfen zu können, mussten diese Positionen bestätigt oder neu definiert werden. Dem Enzym wurden dazu DNA-Substrate mit unterschiedlicher Konstellation der Erkennungsorte zur Spaltung angeboten (Abbildung 8). Das optimale DNA-Substrat (d=82 bp) enthielt zwei invers zueinander orientierte EcoP15I-Erkennungsorte, die einen Kopf-zu-Kopf Abstand von 82 bp besaßen. Darüber hinaus wurde der Spaltort an drei nicht-optimalen DNA-Substraten d=23 bp (der Spaltort liegt im gegenüberliegenden Erkennungsort), d= 0 bp (beide Erkennungsorte grenzen direkt Kopf-an-Kopf aneinander) und E=1 (ein Erkennungsort) bestimmt. Um Interaktionen zwischen EcoP15I-Molekülen *in trans* ausschließen zu können, betrug die Enzymkonzentration in allen Versuche mit DNA-Substraten, die zwei Erkennungsorte enthielten, 2,5 nM. Im Falle des DNA-Substrates E=1 musste die Enzymkonzentration auf 80 nM erhöht werden, um eine auswertbare Spalteffizienz von max. 15 % zu erreichen.

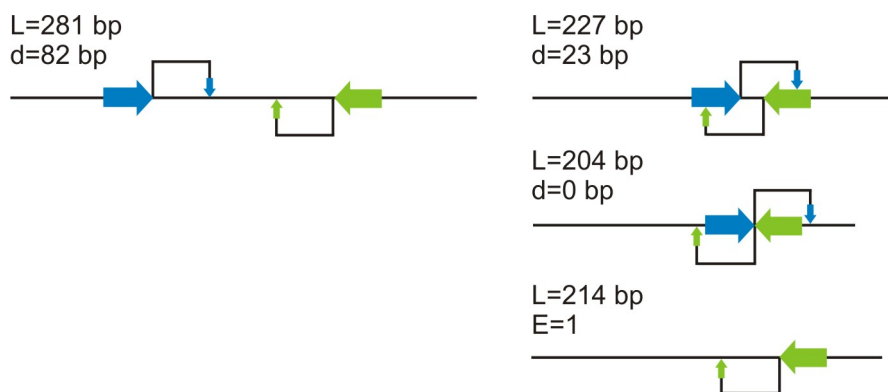


Abbildung 8: Optimale (links) und nicht-optimale (rechts) DNA-Substrate zur Bestimmung des Spaltortes von EcoP15I.

Die EcoP15I-Erkennungsorte sind jeweils als große blaue (Ort A) und grüne (Ort B) Pfeile auf der doppelsträngigen DNA (schwarz) dargestellt, die korrespondierenden Spaltpositionen als kleine blaue und grüne Pfeile. Die Länge und der jeweilige Kopf-zu-Kopf Abstand beider Erkennungsorte sind oberhalb der DNA-Substrate angegeben. Die Bezeichnung E=1 entspricht einem DNA-Substrat mit nur einem EcoP15I-Erkennungsort.

Die DNA-Substrate wurden mittels PCR unter Verwendung von Cyaninfarbstoff 5 (Cy5)- markierten Primern generiert. Nach erfolgter Spaltung durch EcoP15I wurden

die Fragmente parallel zu einer Sequenzierungsreaktion der entsprechenden DNA-Substrate auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Spaltpositionen von EcoP15I konnten anschließend durch den direkten Vergleich der Größe der Spaltprodukte mit der Sequenzierung abgelesen werden.

In Abbildung 9 ist unter (a) die Sequenzierung des oberen Stranges (oben) und des unteren Stranges (unten) als Diagramm dargestellt. Durch die Übertragung der jeweiligen Längen der Spaltprodukte auf die Längen der Sequenzierung ergab sich für das DNA-Substrat $d=82$ bp ein für Ort A und B unterschiedlicher Spaltort (Abbildung 9b). Der Ort B wurde im A-Strang 26 bis 28 Basen nach dem Erkennungsort mit gleicher Häufigkeit gespalten. Im T-Strang dagegen konnten die Positionen 24 bis 26 Basen nach Erkennungsort mit einer differenzierten Präferenz festgelegt werden. Es wurde bevorzugt nach 24 und 25 Basen gespalten. Die Spaltung am Ort A zeigte eine geringere Variabilität in den Spaltpositionen. Im A-Strang wurde nach 24 und 25 Basen gespalten, wobei die Präferenz auf Position 25 lag. Im T-Strang spaltete EcoP15I nur 26 Basen nach dem Erkennungsort.

Die nicht-optimalen DNA-Substrate $d=23$ bp und $d=0$ bp können effizient gespalten werden. Laut DNA-Footprint-Analysen deckt das Enzym nach Bindung an der DNA einen 30 bp langen Bereich ab [71]. Aufgrund dessen ist es räumlich schwer vorstellbar, wie die Interaktion zwischen beiden gebundenen EcoP15I-Molekülen funktioniert, wenn die Erkennungsorte abgedeckt zu sein scheinen. Demzufolge war zu erwarten, dass sich die Spaltorte an diesen DNA-Substraten von denen an einem optimalen DNA-Substrat unterscheiden. In Abbildung 9c ist deutlich zu sehen, dass an nur jeweils einer Position nach dem Erkennungsort eine Spaltung erfolgte. Das DNA-Substrat $d=23$ bp wurde von EcoP15I an beiden Orten nach 24 bp im A-Strang und 26 bp im T-Strang gespalten. Ebenso war die Spaltung des nicht-optimalen Substrates $d=0$ bp möglich, auch wenn hier ebenfalls die Variabilität der Spaltorte eingeschränkt blieb. Die Positionen lagen in beiden Orten 25 bp im A-Strang und 27 bp im T-Strang hinter dem Erkennungsort. Auch in diesem Fall würde das am Erkennungsort gebundene Enzym den gegenüberliegenden Spaltort abdecken. Ob das Fehlen der Variabilität durch eingeschränkte Translokation aufgrund der blockierenden EcoP15I-Moleküle resultiert, konnte in diesen Experimenten nicht festgestellt werden.

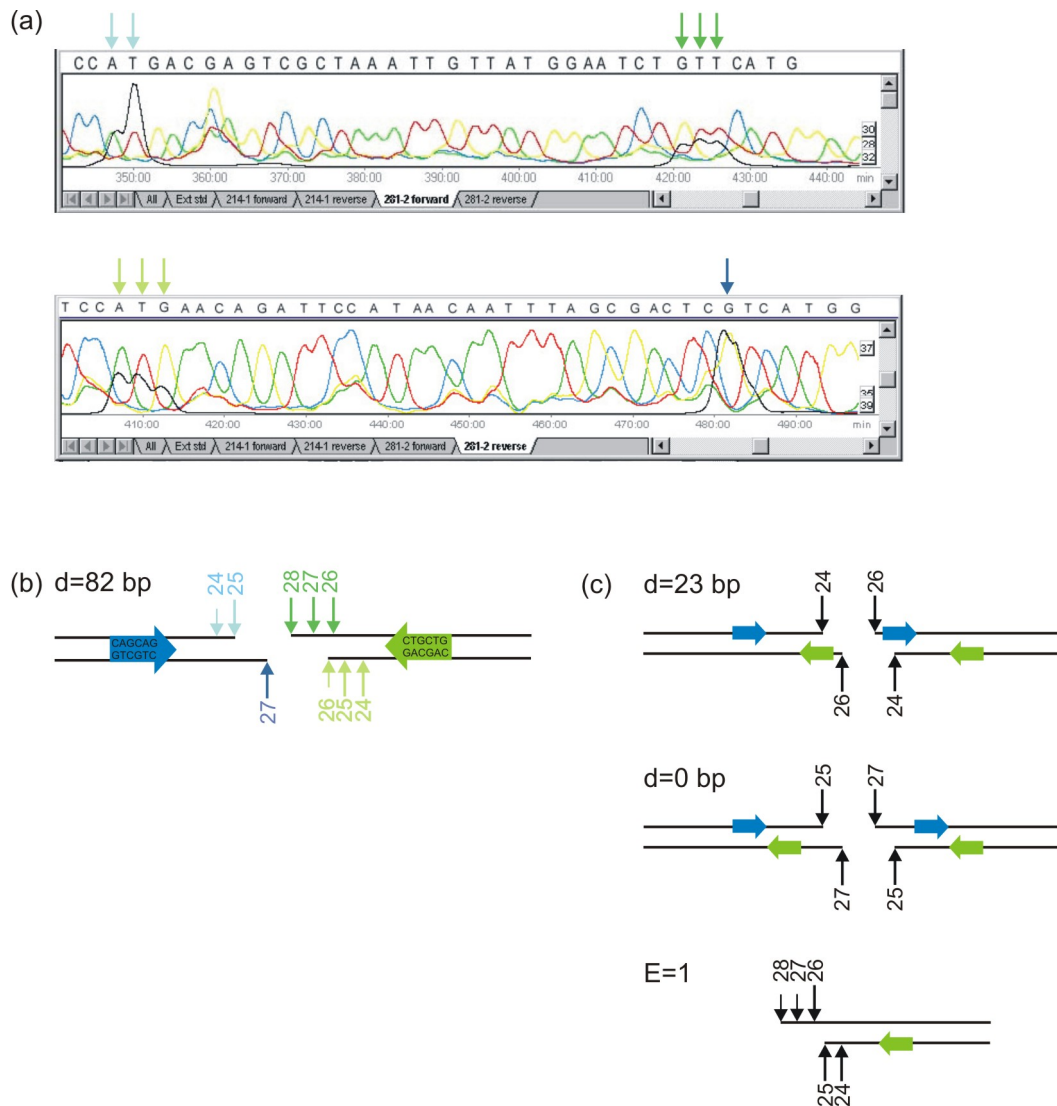


Abbildung 9: Spaltortbestimmung von EcoP15I anhand der Spaltung von optimalen und nicht-optimalen DNA-Substraten.

(a) Sequenzierung des oberen Stranges (oben) und unteren Stranges (unten), die entsprechende DNA-Sequenz ist über den Diagrammen angegeben. Die schwarze Kurve repräsentiert die Längen der durch EcoP15I gespaltenen DNA-Fragmente. Die jeweiligen Spaltpositionen sind durch farbige Pfeile gekennzeichnet. (b) Schematische Darstellung der EcoP15I-Spaltpositionen von DNA-Substrat d=82 bp (zwei EcoP15I Erkennungsorte im Abstand von 82 bp). Die farbigen Pfeile entsprechen den jeweiligen Spaltpositionen in (a). (c) Übersicht der EcoP15I-Spaltpositionen von den DNA-Substraten d=23 bp (zwei Erkennungsorte im Abstand von 23 bp), d=0 bp (zwei Erkennungsorte ohne Abstand) und E=1 (ein Erkennungsort). Die jeweiligen Erkennungsorte für EcoP15I sind als blaue und grüne Pfeile, die Spaltpositionen als schwarze Pfeile gekennzeichnet. Dabei markieren große Pfeile häufig gespaltene und kleine Pfeile weniger häufig gespaltene Positionen.

Die Spaltortbestimmung anhand des Substrats E=1 zeigte hingegen wieder variable Spaltpositionen (vgl. Abbildung 9c, unten). Es ist jedoch zu bemerken, dass in diesem Versuchsansatz die Enzymkonzentration auf 80 nM erhöht wurde, um eine quantitative Auswertung der Spaltung zu erreichen. Somit waren auch Wechselwirkungen der Enzyme *in trans* möglich. Im A-Strang spaltete EcoP15I das Substrat E=1 nach 24 und

25 bp mit gleicher Häufigkeit. Im T-Strang wurden die Positionen 26 mit erhöhter Präferenz und die Positionen 27 und 28 mit geringerer Präferenz detektiert.

Die Ergebnisse der Ermittlung des exakten Spaltortes des EcoP15I Wildtypenzym führten zum Schluss, dass ein optimales DNA-Substrat an variablen Positionen gespalten wurde. Die aus der Literatur bekannten Spaltpositionen konnten genauer definiert werden. Darüber hinaus stellte sich eine Präferenz für einzelne Spaltpositionen heraus. Nicht-optimale DNA-Substrate wurden ohne Variabilität an nur einer Position nach dem Erkennungsort gespalten. Das DNA-Substrat E=1 spaltete EcoP15I mit differenzierter Häufigkeit an variablen Positionen.

2.2.3 Funktionelle Charakterisierung der EcoP15I-Mutanten

2.2.3.1 DNA-Bindung

Zunächst wurden die Dissoziationskonstanten K_D der Enzymmutanten bestimmt. Dieser Wert gibt an, bei welcher Enzymkonzentration die Hälfte des im Ansatz befindlichen DNA-Substrats mit konstanter Konzentration im gebundenen Zustand vorliegt. In Tabelle 1 sind die ermittelten K_D -Werte des EcoP15I Wildtypenzym und den einzelnen Mutanten zusammengefasst.

Tabelle 1: K_D -Werte von EcoP15I und Mutanten an spezifischer DNA.

Die K_D -Werte wurde mit Hilfe von Gel-Shift-Experimenten in Anwesenheit von 5 nM 60-1 DNA (ein EcoP15I-Erkennungsort) und 2 mM ATP bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Enzym	EcoP15I	Nh4	Nh7	Ch4	Ch7	Ch11	Ch18	Ch29	Ch11L3	L3	L10	L23	Endo4	Δ Ch4	Δ Ch7	Δ L
K_D [nM]	7	12	12	16	11	11	6	12	8	13	16	10	6	4	4	4

Der K_D -Wert des EcoP15I Wildtypenzym wurde mit 7 nM Enzymkonzentration bestimmt. Die Werte für die Mutanten lagen zwischen 4 nM und 16 nM. Es konnte nur ein geringfügiger Einfluss der Insertionen und Deletionen auf den K_D -Wert der genetisch veränderten Enzyme festgestellt werden. Diese banden in nahezu gleicher

Intensität an den 60-1 Oligonukleotid-Duplex im Vergleich zum Wildtypenzym. Durch die eingeführten Mutationen wurde das Bindungsverhalten von EcoP15I an spezifische DNA nur gering beeinflusst.

2.2.3.2 Test der Methylierungsaktivität

Zur Überprüfung der Methylierungsaktivität der einzelnen EcoP15I-Mutanten wurden diese für drei Stunden in Anwesenheit von SAM mit dem zirkulären Plasmid pUC19 inkubiert. Die in der DNA-Sequenz enthaltenen EcoP15I-Erkennungsorte sollten dabei durch die Modifikations-Untereinheit methyliert werden und die DNA anschließend nicht mehr durch EcoP15I spaltbar sein. Die DNA-Spaltreaktion wurde durch Zugabe von ATP gestartet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktion konnten eventuelle Spaltprodukte durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert werden. Alle Enzymmutanten waren in der Lage, die pUC19 Plasmid-DNA vollständig zu methylieren (Abbildung 10). Die in die Res-Untereinheit eingeführten Insertionen und Deletionen zeigten demzufolge keinen Effekt auf die Methylierungsaktivität.

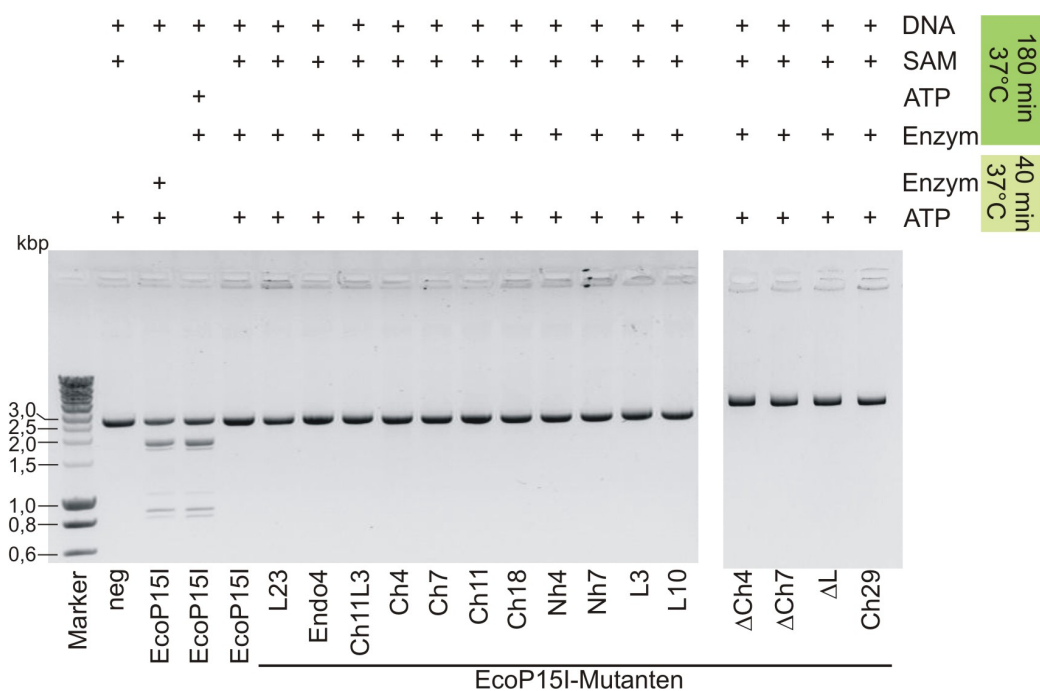


Abbildung 10: Test der Methylierungsaktivität des EcoP15I Wildtypenzym und der EcoP15I-Mutanten.

Zirkuläre pUC19 Plasmid-DNA wurde für 180 min mit den unter dem Bild angegebenen EcoP15I-Mutanten in Anwesenheit von SAM als Methyl donor inkubiert. Die anschließende Spaltreaktion (Dauer 40 min) wurde durch Zugabe von ATP gestartet. Marker: SmartLadder (Eurogentec), die entsprechenden DNA-Fragmentgrößen sind links neben dem Bild angegeben. Neg entspricht einer Negativkontrolle ohne Enzymzugabe.

2.2.3.3 Test der DNA-Spaltaktivität

Die Fähigkeit der Mutanten, HindIII-linearisierte pUC19 Plasmid-DNA zu spalten, wurde mit einem Test der DNA-Spaltaktivität überprüft. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte eine quantitative Auswertung der DNA-Spaltaktivität. Alle Mutanten, außer den Deletionsmutanten Δ Ch4, Δ Ch7 und Δ L, spalteten die DNA (Abbildung 11). Das EcoP15I Wildtypenzym spaltete die DNA nicht vollständig, sondern nur zu 90 %. Insertionen in den C-terminalen Teil der α -Helix (Ch4, Ch11, Ch18, vgl. Abbildung 7) verringerten die DNA-Spaltaktivität auf 68 % (Ch11) bzw. 65 % (Ch4, Ch18) im Vergleich zum Wildtypenzym. Die Mutante Ch7 spaltete nur 39 % der vorhandenen pUC19 Plasmid-DNA. Die Insertion von 29 Aminosäuren (Ch29) führte zu einer fast vollständigen Inaktivierung des Enzyms, denn lediglich 4 % der DNA wurden durch dieses Enzym gespalten.

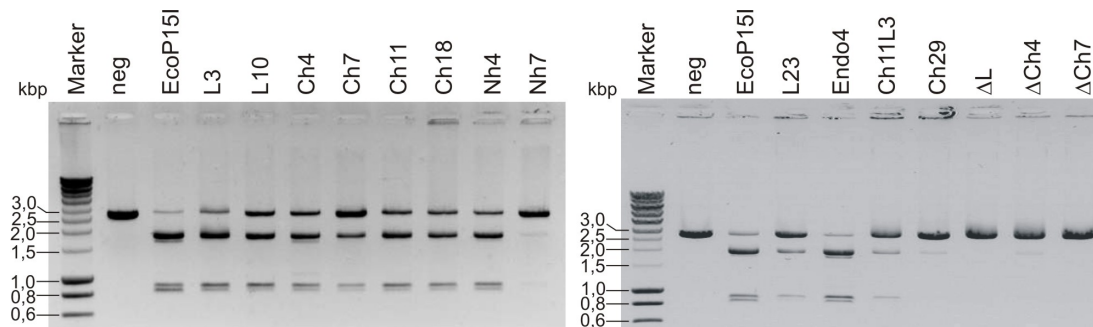


Abbildung 11: Test der katalytischen Aktivität der EcoP15I-Mutanten.

HindIII-linearisierte pUC19 Plasmid-DNA wurde durch EcoP15I Wildtypenzym oder EcoP15I-Mutanten in Anwesenheit von ATP für eine Stunde bei 37°C gespalten. Die jeweiligen EcoP15I-Mutanten sind über den Bildern angegeben. Neg: Negativkontrolle ohne Enzymzugabe. Marker: SmartLadder (Eurogentec) mit den entsprechenden DNA-Fragmentgrößen links neben dem Bild. Die quantitative Auswertung der Spaltung erfolgte mit der Software Phoretix (Nonlinear Dynamics).

Insertionen in der Linkerregion führten zu einer Abnahme der katalytischen Aktivität, je mehr Aminosäuren inseriert wurden. Die Spaltaktivität sank von 82 % (L3) über 64 % (L10) auf 30 % (L23). Die Kombination aus den Mutationen Ch11 und L3 (Doppelmutante Ch11L3) zeigte eine weitere Einschränkung in der Spaltfähigkeit bis auf 19 %.

Der C-terminale Teil der Res-Untereinheit wurde aufgrund der Ergebnisse der limitierten Proteolyse als Endo-Domäne bezeichnet (siehe 2.1), da sich in dem stabil gefalteten Bereich das katalytische Motiv PDX_n(D/E)XK befindet. Auch in dieser Region wurden vier Aminosäuren inseriert (Abbildung 7, Mutante Endo4). Durch Verdopplung

der bereits vorhandenen Aminosäuren ⁷³⁷FAKL zeigte sich kein Einfluss auf die katalytische Aktivität. Die Mutante Endo4 spaltete die DNA mit 92 % fast vollständig.

Im Gegensatz zu Insertionen in den C-terminalen Bereich der α -Helix zeigten Insertionen in den N-terminalen Bereich dieser Sekundärstruktur einen deutlicheren Einfluss auf die katalytische Aktivität. Obwohl die Mutante Nh4 die DNA noch zu 72 % spalten konnte, wurden bei Nh7 nur noch 10 % Aktivität detektiert. Ein 12facher molarer Enzymüberschuss gegenüber DNA erhöhte die Aktivität auf 25 %.

Nach chromatographischer Aufreinigung der EcoP15I-Mutanten Nh4 und Nh7 über eine Heparin-Sepharose-Säule wurde beobachtet, dass der Kontakt der beiden Untereinheiten offenbar gestört ist. Die Reinigung des Enzymkomplexes beruht auf der Interaktion der positiven Ladungen in der Res-Untereinheit mit dem negativ geladenen Säulenmaterial (Heparin-Sepharose). Die Mod-Untereinheit wird durch Bindung an die Res-Untereinheit aufgrund von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit aufgereinigt. Im Falle der Mutanten Nh4 und Nh7 befand sich allerdings ein Teil der Mod-Untereinheit bereits im Durchlauf. Das Ungleichgewicht zwischen beiden Untereinheiten wurde bei Analyse der Elutionsfraktionen in der SDS-PAGE deutlich. Die quantitative Auswertung ergab, dass die Mutante Nh4 27 % und die Mutante Nh7 sogar nur 14 % der Mod-Untereinheit im Vergleich zum Wildtypenzym enthielt (Abbildung 12).

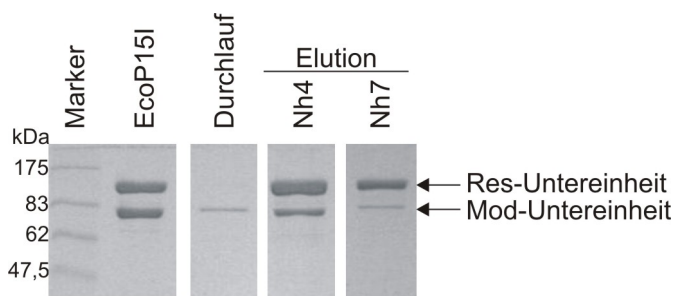


Abbildung 12: SDS-Proteingel der chromatographischen Reinigung der Mutanten Nh4 und Nh7.

EcoP15I wurde als Kontrolle aufgetragen und repräsentiert die Gleichverteilung beider Untereinheiten in der Reinigung des Wildtypenzyms. Der Durchlauf (nach Beladung der Säule mit der Mutante Nh4) enthielt bereits die Mod-Untereinheit. Die Elutionen der Mutanten Nh4 und Nh7 zeigten eine deutliche Unterrepräsentation der Mod-Untereinheit gegenüber der Res-Untereinheit. Marker Prestained Proteinmarker (NEB) mit den entsprechenden Molekulargewichten links neben dem Bild angegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass Insertionen von bis zu 29 Aminosäuren offensichtlich von EcoP15I toleriert werden. Im Gegensatz dazu führte schon eine geringe Anzahl

deletierter Aminosäuren zum vollständigen Verlust der katalytischen DNA-Spaltaktivität der EcoP15I-Mutanten Δ Ch4, Δ Ch7 und Δ L.

2.2.3.4 Messung der ATP-Hydrolyse

EcoP15I gehört zu den NTP-abhängigen Restriktionsendonukleasen [10]. Die Energie aus der Hydrolyse von ATP wird zur Translokation der DNA benötigt. Mit einem kolorimetrischen ATPase-Test wurde der Einfluss der genetischen Manipulation auf die ATP-Hydrolyse untersucht. Der Test beruht auf der spektrophotometrischen Quantifizierung eines Phosphomolybdat-Malachitgrün-Komplexes, durch den anhand einer mitgeführten Eichkurve das freigesetzte anorganische Phosphat berechnet wurde.

Das EcoP15I Wildtypenzym hydrolysierte innerhalb von 60 Minuten 10,2 nmol ATP. Die meisten Mutanten zeigten eine signifikant höhere ATPase-Aktivität als das Wildtypenzym (Abbildung 13). Die Mutanten Ch4 und Ch7 setzten insgesamt 10,0 und 12,5 nmol ATP um. Insertionen von mehr als sieben Aminosäuren in den C-terminalen Bereich der α -Helix führten zu einem höheren Verbrauch. Die Mutanten Ch11 und Ch18 verbrauchten mit 19,1 nmol und 20,3 nmol annähernd doppelt soviel ATP als das Wildtypenzym. Durch weitere Insertionen steigerte sich der Verbrauch nicht mehr. Bei Insertion von 29 Aminosäuren, die acht zusätzlichen Windungen in der α -Helix entsprechen, zeigte sich mit 16,2 nmol ATP ein geringerer Verbrauch im Vergleich zu Ch11 und Ch18. Lediglich durch Kombination der Mutation Ch11 mit L3 konnte ein weiterer Anstieg der ATP-Hydrolyse auf 24,2 nmol ATP erzielt werden. Alle Insertionen in der Linkerregion, unabhängig von der Anzahl der verdoppelten Aminosäuren, zeigten eine fast zweifach erhöhte ATPase-Aktivität in Vergleich zum EcoP15I Wildtypenzym. L3 hydrolysierte 20,5 nmol, L10 20,0 nmol und L23 18,9 nmol ATP. Die Insertion von vier und sieben Aminosäuren in den N-terminalen Bereich der α -Helix führte zu einer starken Verringerung der ATPase-Aktivität. Während die Nh4-Mutante mit 6,7 nmol ATP noch 2/3 der Aktivität des Wildtyps zeigte, konnten bei Mutante Nh7 nur ein Verbrauch von 2,1 nmol ATP gemessen werden. Da dieser Wert nah an der Detektionsgrenze des Testes lag, ist eine Aussage über eine eventuelle Inaktivierung der ATP-Hydrolyse nicht möglich.

Hervorzuheben ist, dass die Deletionsmutanten, ebenfalls unabhängig der Anzahl an deletierten Aminosäuren, die höchste Aktivität im Verbrauch von ATP zeigten. Δ L hydrolysierte in 60 Minuten 28,8 nmol, Δ Ch4 26,7 nmol und Δ Ch7 26,6 nmol. Sie

verbrauchten mehr als das 2,6 fache im Vergleich zum EcoP15I Wildtyp. Die einzige Insertion in der Endo-Domäne von vier Aminosäuren (Endo4) zeigte mit 14,3 nmol ATP eine 1,4 fach erhöhte ATPase-Aktivität.

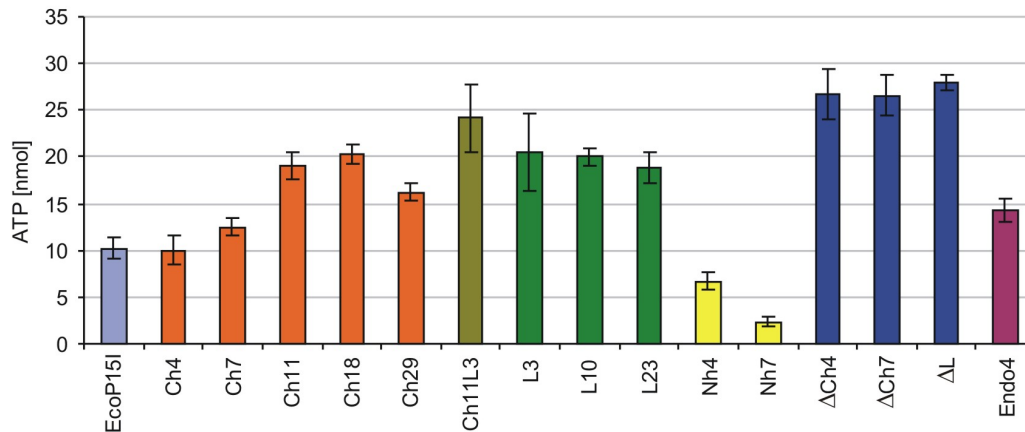


Abbildung 13: ATP-Hydrolyse des EcoP15I Wildtypenzym und den EcoP15I-Mutanten.

In Anwesenheit von 1 mM ATP wurden zwei pmol EcoP15I Wildtypenzym oder EcoP15I-Mutante mit einem pmol zirkulärer pUC19 Plasmid-DNA in Lac-Puffer für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 40 µl. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Malachitgrün-Arbeitslösung und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Absorption bei 630 nm wurde spektrophotometrisch gemessen. Die Mengen an freigesetztem Phosphat konnten anhand einer Standardkurve mit bekannten Mengen an Phosphat (KH_2PO_4) berechnet werden. Die Graphen repräsentieren die Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten unter Angabe der Standardabweichung. Die Farben der Balken kennzeichnen Mutanten mit Insertionen oder Deletionen im selben Aminosäurebereich der EcoP15I-Primärsequenz.

Die Endo4-Mutante zeigte im Zeitverlauf des ATP-Verbrauchs einen erwähnenswerten Effekt. In einem Zeitverlaufsexperiment wurden nach jeweils fünf, zehn, 20, 40 und 60 Minuten Proben von 40 µl aus dem Gesamtansatz entnommen und gemessen. Nach Berechnung der Menge des freien anorganischen Phosphates zeigte sich, dass das EcoP15I Wildtypenzym und alle restlichen Mutanten Enzyme die höchste ATP-Umsatzrate in den ersten fünf Minuten der Reaktion besaßen (Daten für restliche Mutanten nicht gezeigt). Danach sank der ATP-Verbrauch pro Minute. Nach 60 Minuten war jedoch noch kein Plateau erreicht. Die Mutante Endo4 zeigte im Gegensatz zum EcoP15I Wildtypenzym bereits nach 40 Minuten eine maximale ATP-Hydrolyse. Nachfolgende Meßpunkte ergaben keine nennenswerte Änderung der absoluten Menge an ATP (Abbildung 14).

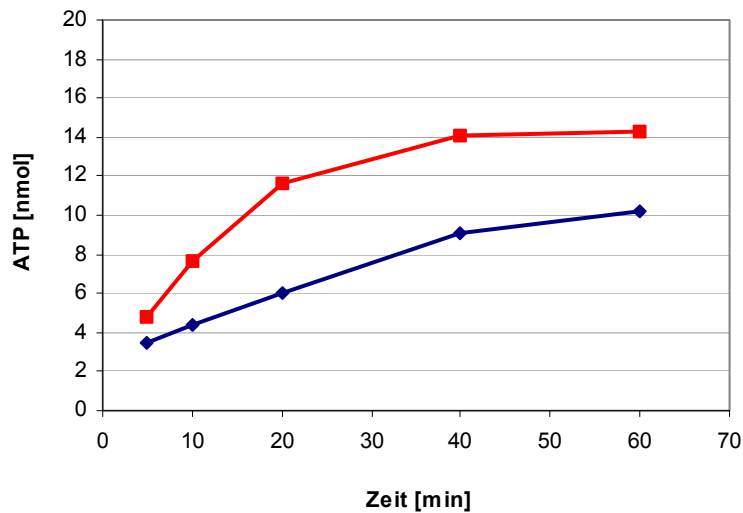


Abbildung 14: Zeitverlauf der ATPase-Aktivität von EcoP15I und Mutante Endo4.

Zeitabhängiger ATP-Verbrauch des EcoP15I Wildtypenzym (blaue Linie) und der Mutante Endo4 (rote Linie). Die ATP-Hydrolyse wurde zu den gekennzeichneten Zeitpunkten durch einen kolorimetrischen Test bestimmt.

2.2.4 Spaltortbestimmung der EcoP15I-Mutanten

Der Einfluss der Aminosäureinsertionen und -deletionen auf den exakten Spaltort der Mutanten wurde anhand der Spaltung des optimalen DNA-Substrates d=82 bp (vgl. Abbildung 8) ermittelt. Ebenso wie bei der Spaltortbestimmung des EcoP15I Wildtypenzym wurden parallel zu den Spaltprodukten die Sequenzierung des DNA-Substrates auf ein denaturierendes Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, um anschließend die exakte Größe der Fragmente bestimmen zu können. Die ermittelten Spaltpositionen der einzelnen EcoP15I-Mutanten sind in der Abbildung 15 zusammengefasst. Die Spaltpositionen an sich blieben im Vergleich zum EcoP15I Wildtypenzym unverändert. Der Erkennungsort A wurde dementsprechend nach 24 und 25 Basen im A-Strang, und nach 27 Basen im T-Strang gespalten. Der Erkennungsort B wurde nach 24 bis 26 Basen im A-Strang und nach 26 bis 28 Basen im T-Strang gespalten. Interessanterweise beschränkten sich alle identifizierten Veränderungen des Spaltbildes auf die Spaltpositionen von Erkennungsort B, wohingegen die Spaltpositionen von Erkennungsort A unverändert blieben.

Eine weitere aufschlussreiche Beobachtung konnte bei den Ch-Mutanten gemacht werden, bei denen durch Insertion einer festgelegten Anzahl an Aminosäuren zusätzliche Windungen in die dem Linker vorgelagerte α -Helix eingeführt wurden (vgl.

Abbildung 7). Es zeigte sich, dass je mehr α -Helix-Windungen eingebaut wurden, desto weiter entfernte sich die Präferenz der Spaltposition vom Erkennungsort (Abbildung 15b). Das EcoP15I Wildtypenzym spaltete bevorzugt die Positionen 24 und 25 und in einem geringeren Maße die Position 26. Durch Insertion einer zusätzlichen Windung (Mutante Ch4) wurden alle Spaltpositionen im A-Strang mit gleicher Häufigkeit benutzt. Das Einfügen von zwei oder drei weiteren Windungen (Ch7 und Ch11) führte zur Verschiebung der Präferenz. Im A-Strang wurde die am weitesten vom Erkennungsort entfernte Spaltposition 26 am häufigsten gespalten. Ebenfalls konnte im T-Strang eine Präferenzverschiebung auf die Position 28 beobachtet werden. Sie entspricht der am weitesten vom Erkennungsort entfernt liegenden Spaltposition. Die Positionen 26 und 27 im T-Strang wurden dementsprechend weniger häufig gespalten. Durch weitere Insertion von insgesamt fünf (Ch18) und acht (Ch29) α -helikalen Windungen konnte dieser beobachtete Effekt nicht weiter gesteigert werden. Bei beiden Mutanten wurde keine Präferenz zu einer der Spaltpositionen detektiert. Im T-Strang spalteten beide Enzyme wie das EcoP15I Wildtypenzym. Die Doppelmutante Ch11L3 bevorzugte die Spaltung der Position 25 im A-Strang. Im T-Strang wurden ebenfalls die gleichen Spaltpositionen des EcoP15I Wildtypenzym detektiert.

Auffallend war, dass Mutanten, die durch Insertion von Aminosäuren am N-terminalen Ende der α -Helix generiert wurden (Nh4, Nh7), das DNA-Substrat häufiger an den Positionen spalteten, die dem Erkennungsort am nächsten waren (Abbildung 15c). Die Position 24 im A-Strang und die Position 26 im T-Strang wurde von beiden Enzymen bevorzugt geschnitten.

Die Insertion von drei bzw. 23 Aminosäuren in die Linkerregion (L3 und L23) hatte keinen Einfluss auf die Spaltpositionen. Die Mutante L10 spaltete dagegen bevorzugt die Positionen 25/26 im A-Strang und 27/28 T-Strang (Abbildung 15d).

Die Endo4-Mutante (Insertion von vier Aminosäuren in die Endo-Domäne von EcoP15I) spaltete im Erkennungsort B den A-Strang wie das EcoP15I Wildtypenzym. Im T-Strang konnte eine geringere Präferenz für Position 26 detektiert werden (Abbildung 15e).

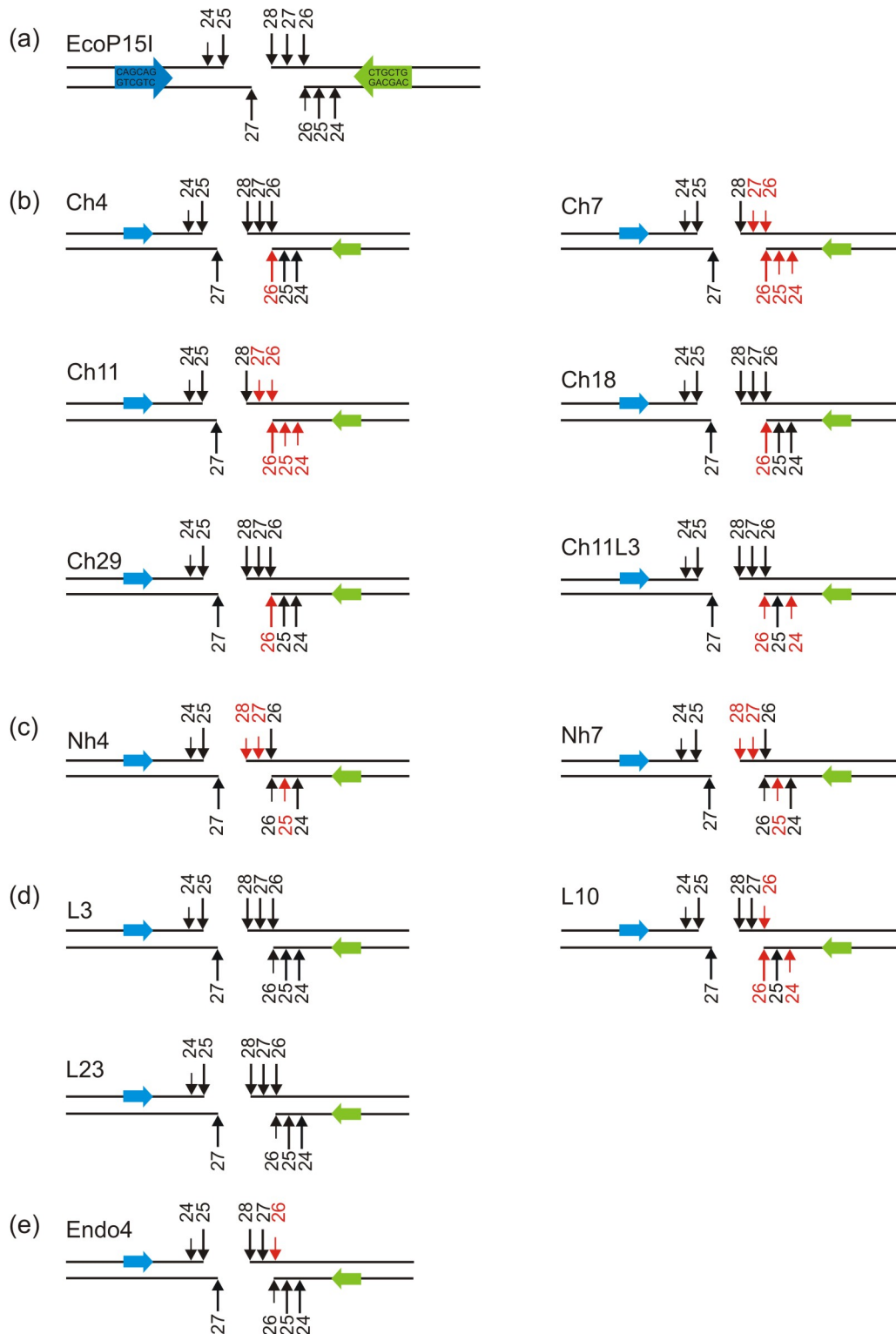


Abbildung 15: Spaltortbestimmung der EcoP15I-Mutanten am DNA-Substrat d=82 bp.

Die Spaltortbestimmung von EcoP15I und den Mutanten erfolgte am DNA-Substrat d=82 bp (vgl. Abbildung 8). Die beiden invers orientierten EcoP15I-Erkennungsorte sind als blaue und grüne Pfeile gekennzeichnet. Rote und schwarze Pfeile markieren die ermittelten Spaltpositionen, wobei ein kleiner Pfeil eine geringere und ein großer Pfeil eine erhöhte Spalt-Effizienz darstellen. Die roten Pfeile kennzeichnen Unterschiede zum Spaltort des EcoP15I Wildtypenzym. (a) Spaltpositionen des EcoP15I Wildtypenzym; (b) Spaltpositionen der Ch-Mutanten, die einzelnen Bezeichnungen der Mutanten sind links neben den Spaltorten angegeben; (c) Spaltorte der Nh-Mutanten; (d) Spaltorte der Linker-Mutanten; (e) Spaltorte der Endo4-Mutante.

Durch das Protein-Engineering von EcoP15I konnte eine Verschiebung der Präferenz für einige Spaltpositionen durch Insertion von zusätzlichen Windungen erreicht werden. Die Mutanten, bei denen die zusätzlichen Windungen in den C-terminalen Teil der α -Helix inseriert wurden, zeigten eine Präferenz für die Spaltposition, die sich am weitesten entfernt von der Erkennungssequenz befand. Die Mutanten dagegen, bei denen eine bzw. zwei Windungen in den N-terminalen Teil der α -Helix eingefügt wurden, zeigten eine Präferenz für die Spaltposition, die dem Erkennungsort am nächsten war. Die Spaltpositionen an sich wurden bei allen Mutanten nicht verändert. Die funktionelle Charakterisierung der Mutanten ergab, dass die genetischen Veränderungen durch Insertion und Deletion von Aminosäuren die ATP-Hydrolyse und die Spalteffizienz der Enzyme beeinflussten. Im Allgemeinen war die Spaltaktivität der Mutanten vermindert. Der ATP-Verbrauch der meisten Mutanten war höher als der des EcoP15I Wildtypenzym. Die katalytisch inaktiven Deletionsmutanten zeigten sogar eine um mehr als das 2,5fach erhöhte ATP-Hydrolyse. Die Methylierungsaktivität und die Affinität der DNA-Bindung blieben unverändert.

2.3 Photochemische Vernetzung von EcoP15I mit spezifischer DNA zur Identifizierung der DNA-Protein-Interaktionsstelle(n)

Direkte Kontaktstellen zwischen spezifischer DNA und einem Protein können durch die kovalente Vernetzung der beiden Reaktionspartner identifiziert werden. Dafür werden die Basen in der DNA mit photoreaktiven Vernetzern modifiziert. Die Modifikationen sind entweder 5-Iodo-2'-desoxycytidin (Y) für Cytosin oder 5-Iodo-2'-desoxyuridin (X) für Adenin, Thymin und Guanin in der DNA-Sequenz. Diese Basenanaloga sind häufig erfolgreich zur Identifizierung der spezifischen DNA-Protein-Bindung eingesetzt worden [72,73,74,75,76]. Beide Modifikationen sind Null-Längen-Vernetzer, die durch UV-Licht eines Helium/Cadmium-Lasers mit einer Wellenlänge von 325 nm aktiviert werden. Dieser Vernetzer bildet dabei eine kovalente Verknüpfung mit den Aminosäuren in einem Protein, die in einem Umkreis von 3 bis 5 Å liegen. Durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 325 nm können unspezifische Vernetzungsprodukte verringert werden, da Nukleinsäure- und Protein-Chromophore weniger stark angeregt werden. X und Y bilden häufig kovalente Bindungen mit elektronenreichen Aminosäureseitenketten, wie Phe, Tyr, Trp, His und Met [77]. Die Ausbeute der Vernetzungsreaktion wird nicht nur durch das Vorhandensein einer reaktiven Seitenkette beeinflusst, sondern auch durch die Orientierung der reagierenden Gruppe.

2.3.1 Photochemische Vernetzung von EcoP15I mit basensubstituierter Oligonukleotid-Duplexen

Zur Identifizierung direkter Kontakte zwischen EcoP15I und den Basen innerhalb des DNA-Erkennungsortes wurden diese durch die photoreaktiven Modifikationen X und Y substituiert (Tabelle 2). Es entstanden Fehlpaarungen als Folge der Substitution für Adenin und Guanin. Aufgrund dessen wurde vor der photochemischen Vernetzung der Einfluss der Substitution auf das Bindungs- und Spaltverhalten von EcoP15I mittels Gel-Shift- und Spalt-Experimenten untersucht. In Tabelle 2 sind die ermittelten Werte zusammengefasst.

Tabelle 2: K_D -Werte und Spaltbarkeit der im EcoP15I DNA-Erkennungsort basensubstituierten Oligonukleotid-Duplexe.

Die Ermittlung der K_D -Werte erfolgte mit Hilfe eines Gel-Shift-Experiments in Anwesenheit von 2 mM ATP und 5 mM des jeweiligen DNA-Oligonukleotid-Duplex. Y = 5-Iodo-2'-desoxycytidin, X = 5-Iodo-2'-desoxyuridin. Die Spaltbarkeit der DNA-Oligonukleotid-Duplexe wurde durch Inkubation von 80 nM DNA und 160 nM EcoP15I in Anwesenheit von 2 mM ATP für 60 Minuten bei 37 °C überprüft.

Bezeichnung A-Strang K_D -Wert [nM] Spaltung				Bezeichnung T-Strang K_D -Wert [nM] Spaltung			
60-1	CAGCAG	13	+	60-1c	CTGCTG	13	+
C1	Y AGCAG	42	-	cC1	Y TGCTG	45	+
A2	CX GCAG	41	-	cT2	CX GCTG	14	+
G3	CA X CAG	31	-	cG3	CT X CTG	38	-
C4	CAG Y AG	14	+	cC4	CTG Y TG	17	+
A5	CAGC X G	16	-	cT5	CTGC X G	24	+
G6	CAGCA X	30	-	cG6	CTGCT X	39	-

Die Gel-Shift-Experimente mit [γ - 32 P] markierten, modifizierten Oligonukleotid-Duplexen zeigten, dass die Bindung an die DNA durch Einführung der Modifikation an den einzelnen Positionen des DNA-Erkennungsortes kaum beeinträchtigt war. Eine maximal dreifach schlechtere Bindung konnte detektiert werden. EcoP15I bildete mit allen modifizierten Oligonukleotid-Duplexen Komplexe.

Im Gegensatz dazu stellte sich heraus, dass die Spaltung offenbar von den Fehlpaarungen beeinflusst war. EcoP15I tolerierte im A-Strang nur die modifizierte Position des zweiten C. Oligonukleotid-Duplexe mit anderen modifizierten Basen konnten nicht gespalten werden. Im T-Strang dagegen wurden mehrere modifizierte Positionen toleriert: cC1, cT2, cC4 und cT5 (Tabelle 2). Offensichtlich konnten nur Oligonukleotid-Duplexe gespalten werden, die vollständig mit dem Gegenstrang hybridisierten.

Die Ergebnisse der Gel-Shift- und Spalt-Experimente ließen keine Rückschlüsse auf die Effizienz der Vernetzung mit den modifizierten Oligonukleotid-Duplexen zu. Aus diesem Grund wurden alle der modifizierten und mit [γ - 32 P] markierten Oligonukleotid-Duplexe in den Versuch der Vernetzung von DNA mit EcoP15I einbezogen (Abbildung 16). Für erste Versuche wurde eine Belichtungszeit von 45 Minuten je Ansatz gewählt. EcoP15I bildete mit den modifizierten Oligonukleotid-Duplexen A2 und A5 ein Vernetzungsprodukt, das sowohl in der SDS-PAGE als auch im autoradiographischen Bild deutlich wurde (Abbildung 16, rote Pfeile). Die quantitative Auswertung ergab eine maximale Vernetzungseffizienz von 2 %. Durch Optimierung des Versuchsansatzes (Veränderung der molaren Verhältnisse von Enzym zu Oligonukleotid-Duplex, Austausch von Mg^{2+} mit Ca^{2+}) konnte keine Steigerung der Vernetzungseffizienz erzielt werden.

Zusätzlich dazu wurde die Vernetzung von EcoP15I mit Oligonukleotid-Duplexen, die eine Basensubstitution an den im Abschnitt 2.2.2 identifizierten Spaltpositionen besaßen, untersucht. Allerdings konnten auch diese die Vernetzungseffizienz nicht steigern (Daten nicht gezeigt).

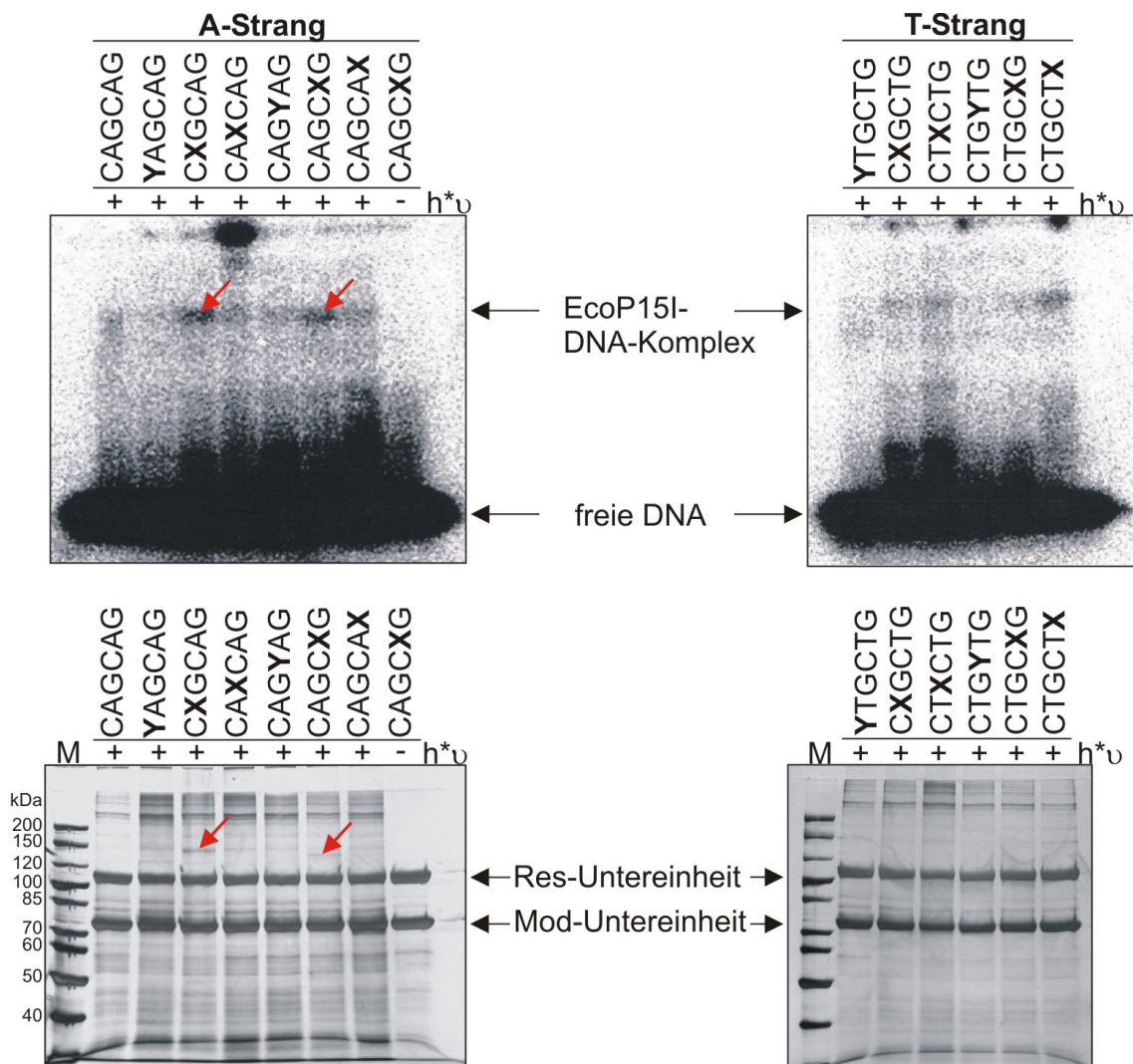


Abbildung 16: Autoradiographisches Bild (oben) und SDS-PAGE (unten) der Vernetzungsreaktion von EcoP15I mit den jeweiligen basensubstituierten Oligonukleotid-Duplexen.

Die Modifikationen im A-Strang sind rechts und die Modifikationen im T-Strang sind links dargestellt. Die roten Pfeile markieren den vernetzten EcoP15I-DNA-Komplex. M PageRuler (Fermentas), die entsprechenden Molekulargewichte sind links neben der SDS-PAGE angegeben.

2.3.2 Photochemische Vernetzung von EcoP15I mit Phosphatrückgrat-modifizierten Oligonukleotid-Duplexen

Aufgrund der geringen Ausbeute an Vernetzungsprodukten bei der photochemischen Vernetzung von EcoP15I mit den basensubstituierten Oligonukleotid-Duplexen wurde eine zweite Methode getestet. Die Modifikation befand sich hierbei am Phosphatrückgrat der DNA. Als photoreaktive Substanz wurde p-Azidophenacylbromid (p-APB) verwendet. Auch diese Vernetzungssubstanz wurde schon erfolgreich in

einigen Studien zur Identifizierung von DNA-Protein-Interaktionsstellen eingesetzt [78,79,80,81]. Das p-APB bildete dabei eine kovalente Verknüpfung mit der Aminosäure des Proteins, die sich innerhalb der Reichweite von 11 Å befand. Die Kopplung der photoreaktiven Substanz p-APB an das als Phosphorothioat modifizierte Phosphat im Oligonukleotid-Duplex erfolgte durch eine spontane Reaktion des Schwefelatoms bei Raumtemperatur. Der so entstandene modifizierte und photoreaktive Oligonukleotid-Duplex musste weitestgehend vor Licht geschützt werden, um ein Abreagieren der reaktiven Gruppe des p-APB zu verhindern. Die Vernetzung von Protein und DNA erfolgte durch Belichtung mit einer UV-Lampe bei 365 nm.

2.3.2.1 Analytische Ansätze zur Optimierung der Vernetzungseffizienz

Für EcoP15I wurden Phosphorothioat-Modifikationen im Phosphatrückgrat nur für den A-Strang des Erkennungsortes ausgewählt, da dieser in der basensubstituierten Vernetzung etwas effizienter zu verknüpfen war als der T-Strang. In einer ersten Vernetzungsreaktion von EcoP15I und den im Phosphatrückgrat modifizierten Oligonukleotid-Duplexen zeigte sich, dass mit dieser Methode die Positionen A2 und G6 offensichtlich in nahem Kontakt zur DNA standen (Abbildung 17). Alle weiteren Versuche fokussierten sich auf den an Position A2 modifizierten Oligonukleotid-Duplex, da mit beiden Vernetzern (X/Y und p-APB) ein Komplex detektiert werden konnte. Die Vernetzungsausbeute betrug maximal 2 %. Auffallend war, dass für die modifizierte Position C1 ein Vernetzungsprodukt mit einer geringeren molekularen Größe identifiziert werden konnte. Die Vernetzungsprodukte der anderen Positionen besaßen die gleiche molekulare Größe.

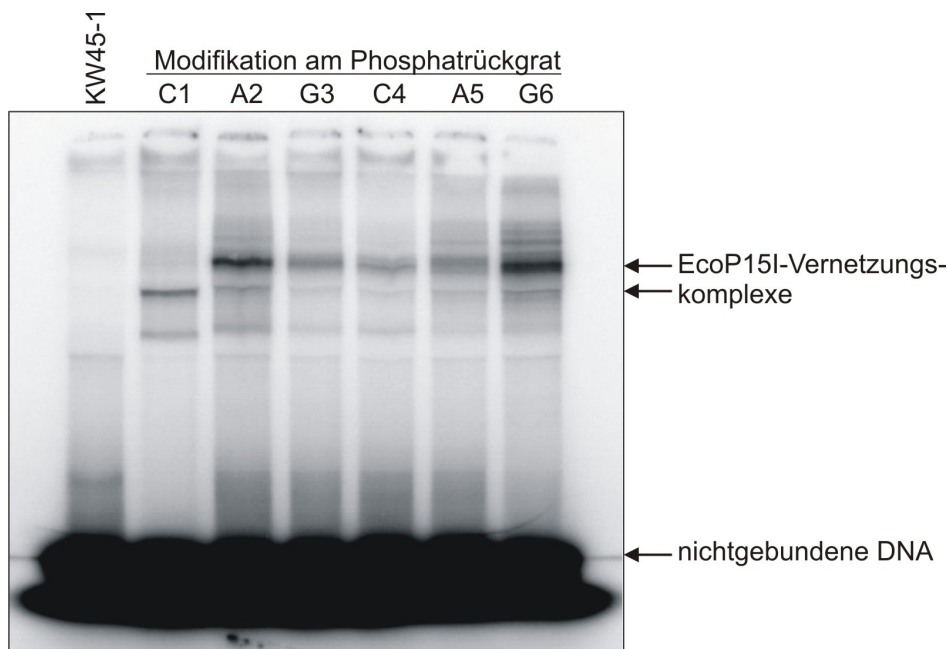


Abbildung 17: Autoradiographisches Bild der photochemische Vernetzung von EcoP15I mit im Phosphatrückgrat modifizierten, radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid-Duplexe.

Die DNA-Oligonukleotid-Duplexe mit den jeweiligen modifizierten Positionen im Phosphatrückgrat sind oberhalb des Bildes angegeben. Die Pfeile rechts neben dem Bild kennzeichnen die Vernetzungskomplexe aus DNA und EcoP15I (oben) und die nichtgebundene DNA (unten). Als Kontrolle wurde der nicht-modifizierte DNA-Oligonukleotid-Duplex KW45-1 mitgeführt.

Da sowohl die Phosphorothioat- als auch die p-APB-Modifizierung einen gewissen Platz (molekulare Größe) einnehmen, wurde der Einfluss auf die Bindungsaffinität von EcoP15I an diese Oligonukleotid-Duplexe untersucht (Tabelle 3). Die ermittelten Bindungskonstanten (K_D -Werte) zeigten eine Verbesserung der Bindung zwischen 40 und 130 % im Vergleich zum nicht-modifizierten Oligonukleotid-Duplex KW45-1.

Tabelle 3: K_D -Werte der im Phosphatrückgrat modifizierten DNA-Oligonukleotid-Duplexe.

Die K_D -Werte wurden mit Hilfe eines Gel-Shift-Experimentes in Anwesenheit von 2 mM ATP und 5 mM dem entsprechenden Oligonukleotid-Duplex ermittelt. Alle Oligonukleotid-Duplexe enthielten einen EcoP15I Erkennungsort, der an den angegebenen Positionen ein Phosphorothioat und die p-APB-Modifizierung besaß. Die ermittelten Werte stellen die Durchschnittswerte aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

Oligonukleotid-Duplex	KW45-1	PCL-C1	PCL-A2	PCL-G3	PCL-C4	PCL-A5	PCL-G6
K_D -Wert [nM EcoP15I]	19	nicht auswertbar	11,5	nicht bestimmt	6	nicht bestimmt	9,5

Die Spaltbarkeit der modifizierten Oligonukleotid-Duplexe konnte nicht untersucht werden, da diese Syntheseabbruchprodukte enthielten und dadurch eine Unterscheidung in Spalt- oder Abbruchprodukte nicht möglich war.

Der Zeitverlauf der Vernetzungsreaktion ergab, dass eine Bestrahlung der Probe von zwei Minuten ausreichend war, um eine maximale Vernetzung zu erreichen (Abbildung 18). Längere Bestrahlungszeiten führten, wahrscheinlich aufgrund von Photolysereaktionen, zu einer Abnahme des Vernetzungsproduktes.



Abbildung 18: Zeitverlauf der Vernetzungsreaktion von EcoP15I mit dem im Phosphatrückgrat modifizierten Oligonukleotid-Duplex PCL-A2.

Radioaktiv markierter Oligonukleotid-Duplex PCL-A2 wurde in Anwesenheit von EcoP15I mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt. Nach einer Belichtungszeit von 10 s, 30 s, 1 min, 2 min und 4 min wurden die Ansätze im SDS-PAGE aufgetrennt. Die quantitative Auswertung der Vernetzungsreaktion erfolgte mit Hilfe des Phosphorimager und der Software ImageQuant.

Die Optimierung des Versuchsansatzes durch Veränderung der molaren Verhältnisse von EcoP15I zu Oligonukleotid-Duplex und Austausch von Mg^{2+} mit Ca^{2+} im Reaktionspuffer erzielte keine Erhöhung der Vernetzungseffizienz.

Für die angestrebte massenspektrometrische Analyse des DNA-Protein-Komplexes und Identifizierung der Kontaktstelle zwischen EcoP15I und DNA war es notwendig, das Protein nach der Vernetzung mit Hilfe von Proteasen zu verkleinern. Dazu mussten in weiteren analytischen Ansätzen die optimalen Bedingungen für den proteolytischen Verdau des DNA-Protein-Komplex gefunden werden. Ziel dabei war es, ein möglichst homogenes DNA-Peptid zu erhalten. Als mögliche Proteasen wurden Trypsin, Chymotrypsin und Proteinase K getestet (Abbildung 19). Es stellte sich heraus, dass durch den Verdau des Komplexes mit Trypsin kein einheitliches Produkt generiert werden konnte. In einem denaturierenden Polyacrylamidgel wurden stets zwei DNA-

Peptid-Komplexe gesehen (Abbildung 19, Bahn Trypsin). Auch durch Veränderung der molaren Verhältnisse von Protein zu Protease oder die Länge der Inkubation konnte kein einheitliches Produkt generiert werden (Daten nicht gezeigt). Allein der Verdau des DNA-Protein-Komplexes mit Chymotrypsin brachte ein homogenes Produkt hervor. Nach Verdau mit Proteinase K konnte überhaupt kein Produkt detektiert werden. Wahrscheinlich war das proteolytische Produkt von so geringer Größe, dass es elektrophoretisch nicht von der freien DNA getrennt dargestellt werden konnte.

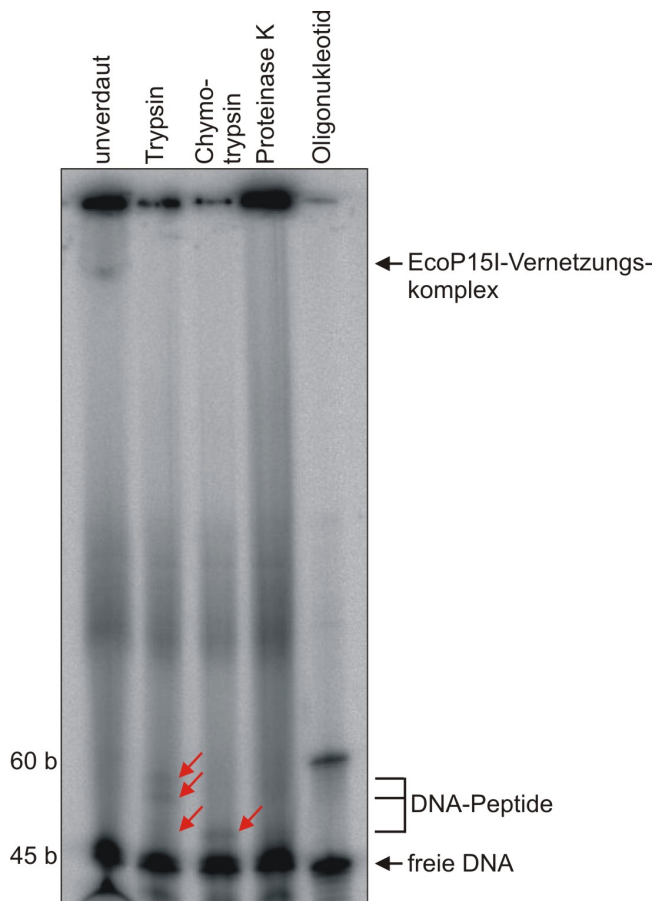


Abbildung 19: Autoradiographisches Bild des proteolytischen Verdau der EcoP15I-DNA-Vernetzungsprodukte mit Trypsin, Chymotrypsin oder Proteinase K.

Auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (8 %, 8 M Harnstoff) wurden die Protease-verdauten Vernetzungsprodukte aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Pfeile markieren den EcoP15I-DNA-Vernetzungs-komplex (oben) und die proteolytisch verdauten DNA-Peptid-Komplexe (unten, mit rotem Pfeil markiert). Die nichtgebundene freie DNA ist durch den untersten Pfeil gekennzeichnet. Die entsprechenden Größen der zusätzlich aufgetragenen Oligonukleotide sind links neben dem Bild angegeben.

Für einen präparativen Ansatz wurden abschließend folgende Reaktionsbedingungen festgelegt: CL-Puffer mit Ca^{2+} statt Mg^{2+} , 1 mM ATP, molares Verhältnis von Enzym zu Erkennungsort 1:1, Belichtungszeit 2 min bei 365 nm und EcoP15I-Konzentration von 0,25 pmol/ μl in einem maximalen Reaktionsvolumen von 200 μl .

2.3.2.2 Präparativer Ansatz der Vernetzung von EcoP15I und PCL-A2 und Identifizierung der Kontaktstellen mittels Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der direkten Kontaktstelle von EcoP15I mit dem DNA-Erkennungsort musste eine Menge von mindestens 50 pmol DNA-EcoP15I-Komplex hergestellt werden. Da nur von einer maximalen Effizienz von 2 % und von einem Verlust von 50 % während der weiteren Aufreinigungsprozedur ausgegangen werden musste, war es nötig, insgesamt 5 nmol EcoP15I in der Vernetzungsreaktion einzusetzen. Alle Ansätze wurden anschließend mit Chymotrypsin verdaut. Der Erfolg der Vernetzungsreaktion und des chymotryptischen Verdaus wurde durch Probenentnahme und Kontrolle auf einem 8 % Polyacrylamidgel überprüft (Abbildung 20).

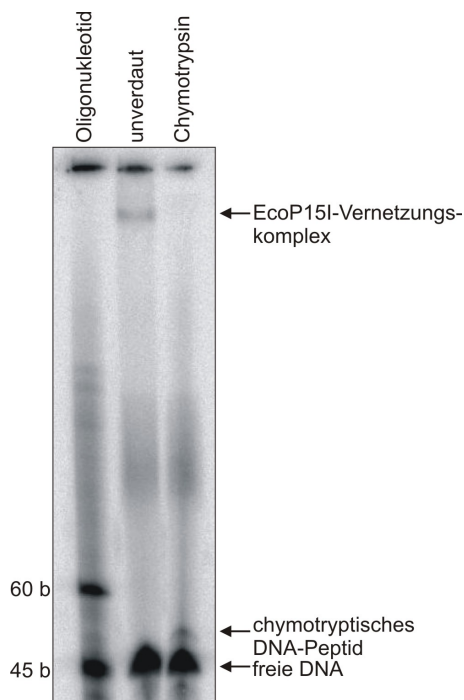


Abbildung 20: Kontrolle des chymotryptischen Verdaus des präparativen EcoP15I-DNA-Vernetzungsansatzes.

Den einzelnen Vernetzungsansätzen wurden vor (Bahn unverdaut, Pfeil oben) und nach dem chymotryptischen Verdaus (Bahn Chymotrypsin, Pfeil Mitte) Proben entnommen und auf einen denaturierenden 8 % Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Zur Orientierung wurden Oligonukleotide mit einer Größe von 45 und 60 Basen (links neben dem Bild angegeben) aufgetrennt. Die freie nichtgebundene DNA ist durch den unteren Pfeil markiert.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl die Vernetzungsreaktion als auch die chymotryptische Proteolyse des DNA-EcoP15I-Komplex erfolgreich waren, wurden die DNA-Peptid-Komplexe chromatographisch von den ungebundenen Peptiden über eine Eisen (III)- immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie [Fe(III)-IMAC] getrennt.

Dabei wurde die negative Ladung der DNA genutzt, um sie an mit Fe(III) beladenen Agarose-Beads zu koppeln. Alle unvernetzten Peptide banden nicht an die Beads und befanden sich im Durchlauf. Die Elution der DNA-Peptid-Komplexe erfolgte durch Erhöhung des pH-Wertes von 2,0 auf 10,5. Alle Elutionen wurden anschließend evaporiert und zur massenspektrometrischen Analyse übergeben.

Die weiteren hier beschriebenen Analysen wurden von Frau Dr. H. Geyer am Institut für Biochemie des Universitätsklinikum Gießen durchgeführt. Nach Hydrolyse der DNA durch Flusssäure wurde ein massenspektrometrisches Übersichtsspektrum aufgenommen (Abbildung 21). Es konnten drei Hauptsignale mit einem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) von 992 m/z , 1042 m/z und 1109 m/z detektiert werden. Ein weniger intensives Signal konnte mit 1523 m/z gemessen werden. Alle anderen Signale mit geringer Intensität wurden nicht in weitere Untersuchungen einbezogen, da es sich hier um mögliche Verunreinigungen handelte. Die oben genannten Signale konnten in einem zweiten aufgenommenen Spektrum reproduziert werden. Sie gehörten somit sehr wahrscheinlich zum Vernetzungsprodukt von EcoP15I und DNA.

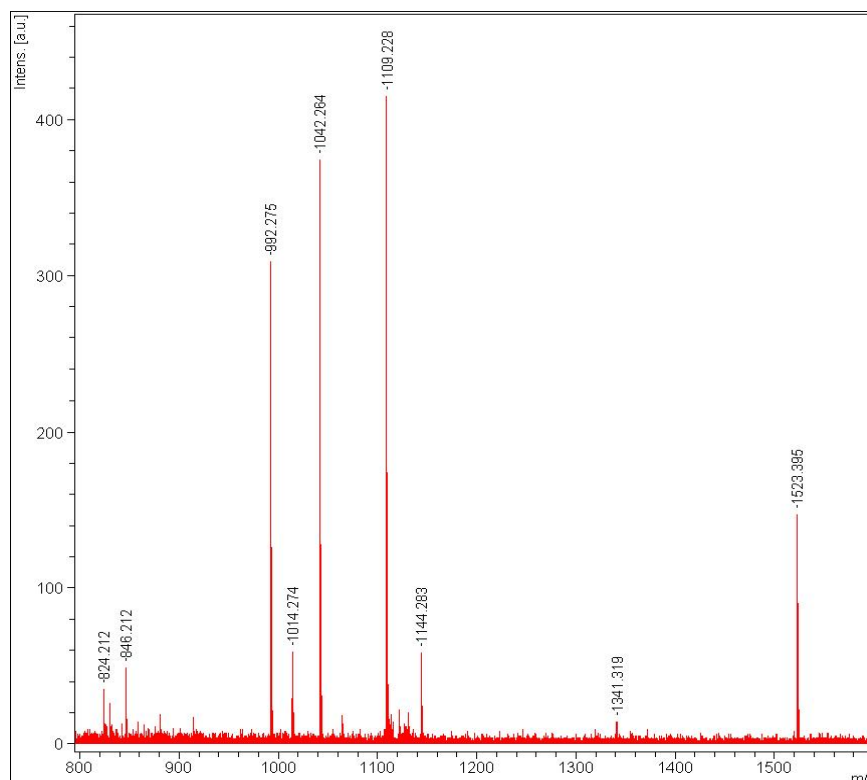


Abbildung 21: MALDI-TOF Übersichtsspektrum der EcoP15I-Vernetzungsprodukte, die nach Elution der DNA-Peptide von der Fe(III)-IMAC Säule mit anschließender HF-Behandlung erhalten wurden.

Die Signale entsprechen den möglichen Peptiden, die nach Verdau mit Chymotrypsin entstanden sind.

Zur Identifizierung der direkten Kontaktstellen wurden die einzelnen Peptide fragmentiert. Die Sequenzierung eines Peptids mit bestimmter Masse ist durch eine Tandem-MS möglich. Dabei werden zwei Massenspektrometer, die mit einer Kollisionszelle verbunden sind, hintereinander geschaltet. Darin wird das Peptid aufgrund einer hohen Energie in einzelne Bruchstücke zerteilt, deren Größe im zweiten Massenspektrometer detektiert wird. Auf diese Weise konnten die einzelnen Sequenzen durch Berechnung der Differenzen der einzelnen Signale und anschließender Zuordnung zu einer Aminosäure identifiziert werden (Abbildungen 22-24).

Die Abbildung 22 zeigt das erhaltene Spektrum, das nach Fragmentierung des Peptids mit 1524 m/z aufgenommen wurde. Die Sequenzwiederfindung in diesem Peptid war nicht vollständig und die Signale mit höchster Intensität konnten nicht zugeordnet werden. Ein putatives Peptid befindet sich in der Mod-Untereinheit: Aminosäuren 628-638 mit der Sequenz KSYANKKSIEL. Der Vernetzungspunkt von DNA und Protein wäre sehr wahrscheinlich über den Serinrest zu erwarten.

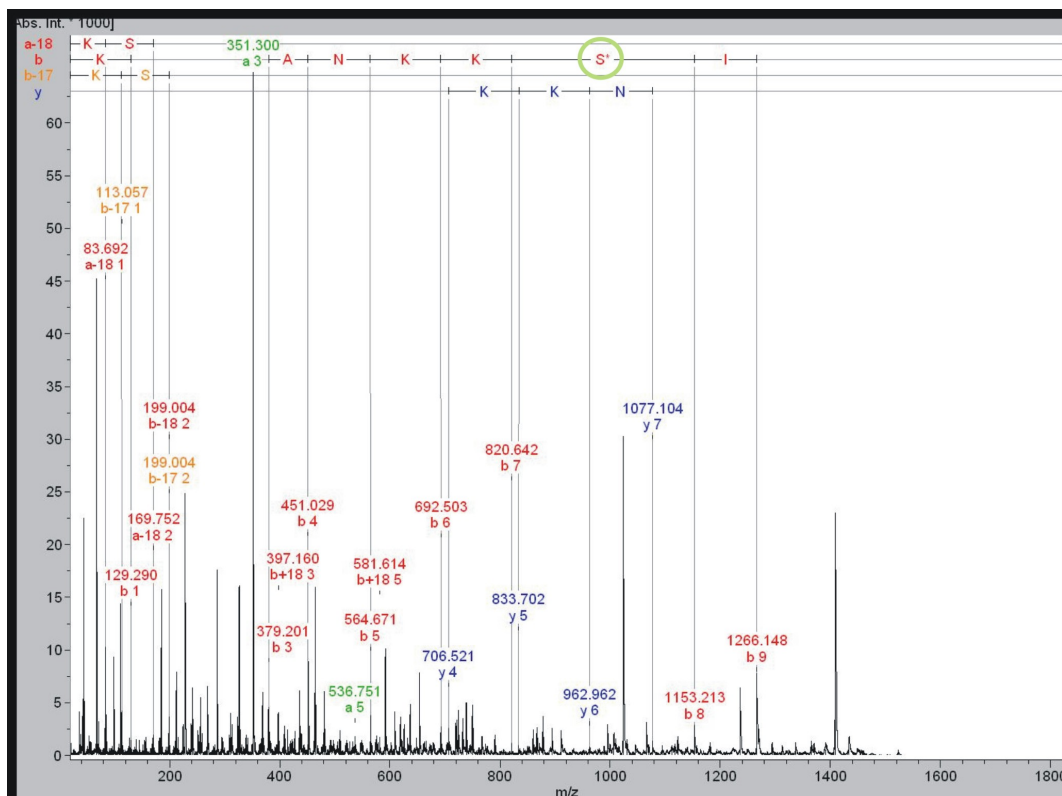


Abbildung 22: Identifizierung der vernetzten Aminosäure von EcoP15I durch Fragmentierung des chymotryptischen Peptids mit dem Wert 1524 m/z mittels MALDI-TOF-MS/MS.

Die Sequenz des identifizierten Peptids ist über dem Spektrum angegeben. Die vernetzte Aminosäure Serin ist mit einem grünen Kreis gekennzeichnet.

In der Abbildung 23 ist das Fragmentspektrum des Peptids mit dem Wert 1042 m/z dargestellt. Die detektierten Signale deuteten auf ein Peptid in der Res-Untereinheit mit der Sequenz NAQYII (Aminosäure 245 bis 251) hin. Entsprechend der Differenzen der einzelnen Signale wäre die Aminosäure Tyrosin mit dem Peptid verknüpft. Auch in diesem Spektrum konnten die Signale mit höchster Intensität nicht vollständig zugeordnet werden.

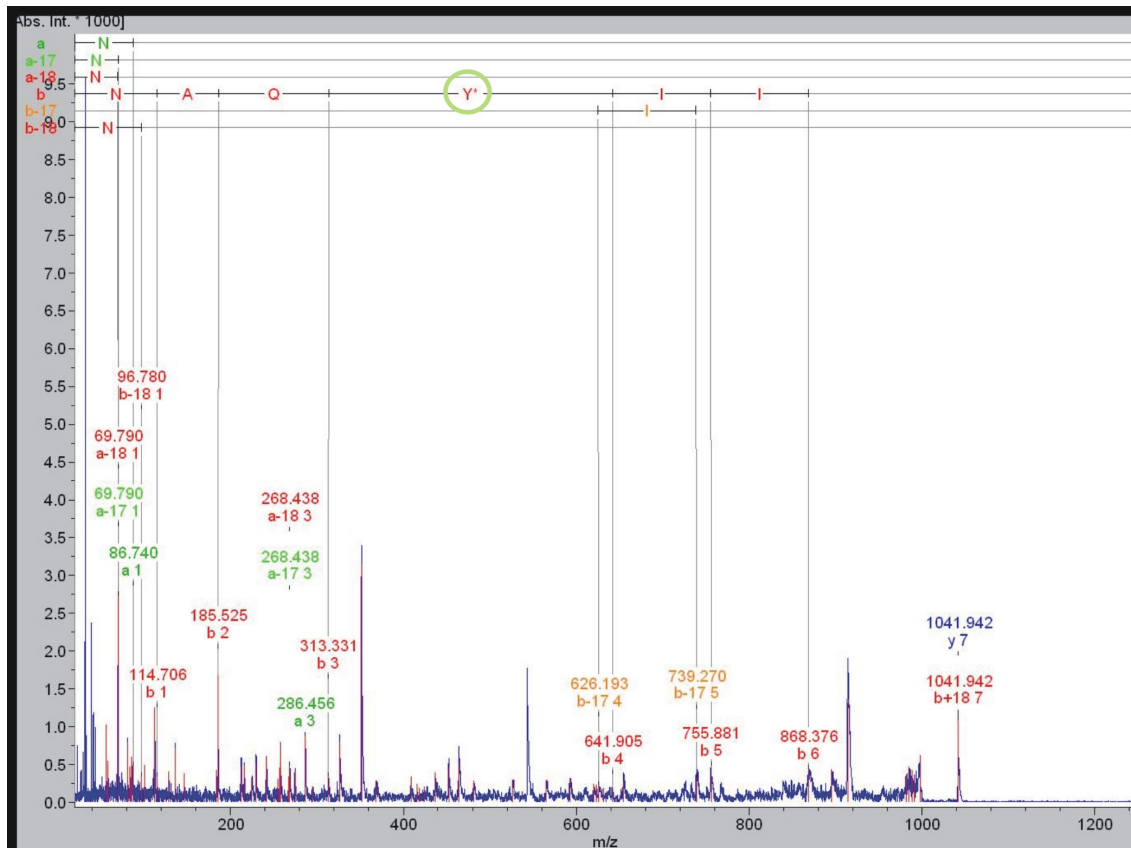


Abbildung 23: Identifizierung der vernetzten Aminosäure von EcoP15I durch Fragmentation des chymotryptischen Peptids mit dem Wert 1042 m/z mittels MALDI-TOF-MS/MS.

Die Sequenz des identifizierten Peptids ist über dem Spektrum angegeben, die vernetzte Aminosäure Tyrosin mit einem grünen Kreis markiert.

Die Abbildung 24 stellt das Fragmentspektrum des Peptids mit dem Wert 1109 m/z dar. Das identifizierte Peptid mit der Sequenz KTKFEEY konnte den Aminosäuren 421 bis 427 in der Res-Untereinheit zugeordnet werden. Die Verknüpfungsposition von EcoP15I mit der DNA wäre mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Aminosäure Lysin in der ersten Position zu erwarten. Da die Sequenz anhand verschiedener Ionentypen (vgl. Abbildung 24 oben links: b+18, y-17) identifiziert worden ist, entsprach sie mit hoher Wahrscheinlichkeit dem im Übersichtspektrum identifizierten Peptid mit dem Wert 1109 m/z.

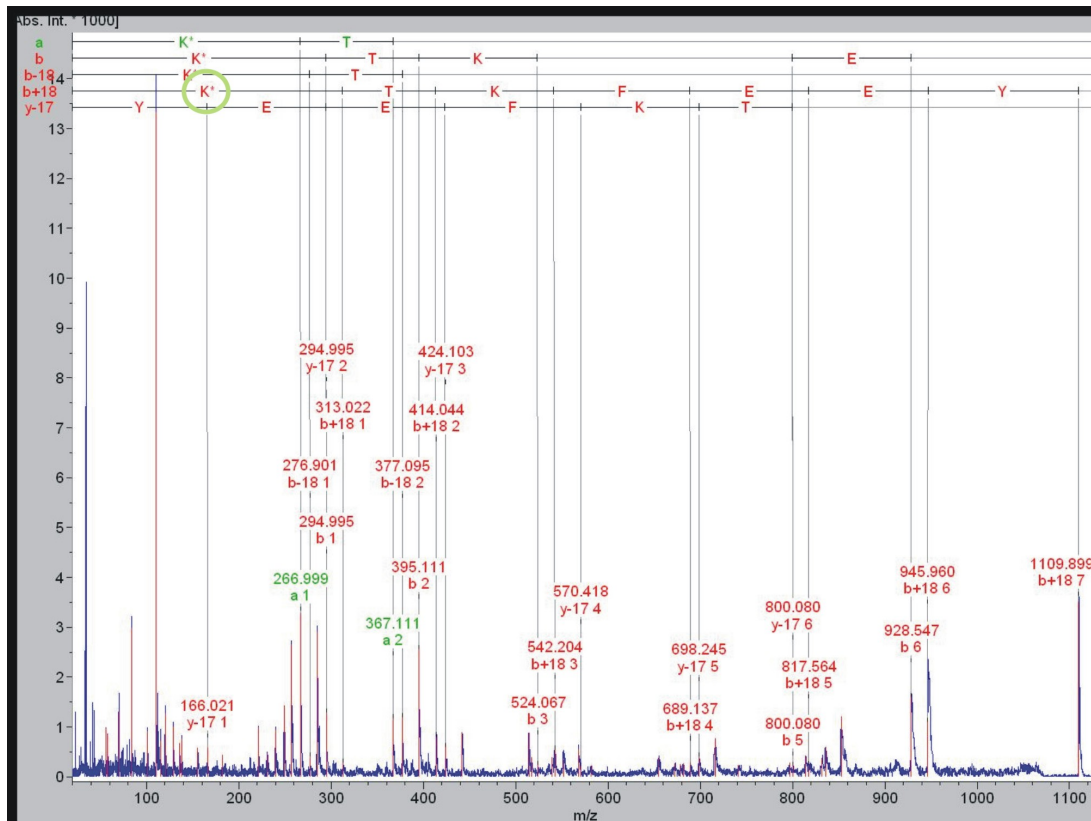


Abbildung 24: Identifizierung der vernetzten Aminosäure von EcoP15I durch Fragmentation des chymotryptischen Peptids mit dem Wert 1109 m/z mittels MALDI-TOF-MS/MS.

Die identifizierte Peptidsequenz KTKFEEY ist über dem Spektrum angegeben. Die vernetzte Aminosäure Lysin an der ersten Position ist mit einem grünen Kreis markiert.

2.3.2.3 Bestätigung der putativen Kontaktstellen durch Mutagenese

Ob die identifizierten Aminosäuren von EcoP15I die Kontakte zur DNA ausbilden, wurde durch den Austausch dieser Aminosäuren mit Alanin überprüft. Alanin besitzt keine Seitenketten und könnte demzufolge keine kovalente Verbindung mit dem Vernetzer ausbilden. Entsprechend den massenspektrometrischen Ergebnissen wurden die Aminosäuren S635 in der Mod-Untereinheit, Y248 und K421 in der Res-Untereinheit gleichzeitig mittels ortsspezifischer Mutagenese mit Alanin ersetzt. Die Reinigung der Mutante SYK3A erfolgte über Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie.

Zum Vergleich der Vernetzungseffizienz wurden das EcoP15I Wildtypenzym und die Mutante SYK3A in die Reaktion eingesetzt. In der Abbildung 25 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Die quantitative Auswertung von fünf unabhängigen Versuchen

ergab einen geringen, aber signifikanten Unterschied zwischen der Vernetzungsausbeute von EcoP15I (1,95 % \pm 0,25) und der Mutante SYK3A (1,26 % \pm 0,14). Anhand eines Gel-Shift-Experimentes konnte festgestellt werden, dass die Mutation keinen Einfluss auf die DNA-Bindung hatte. Die DNA-Spaltaktivität der Mutante SYK3A entsprach nach quantitativer Auswertung der des EcoP15I-Wildtypenzym.

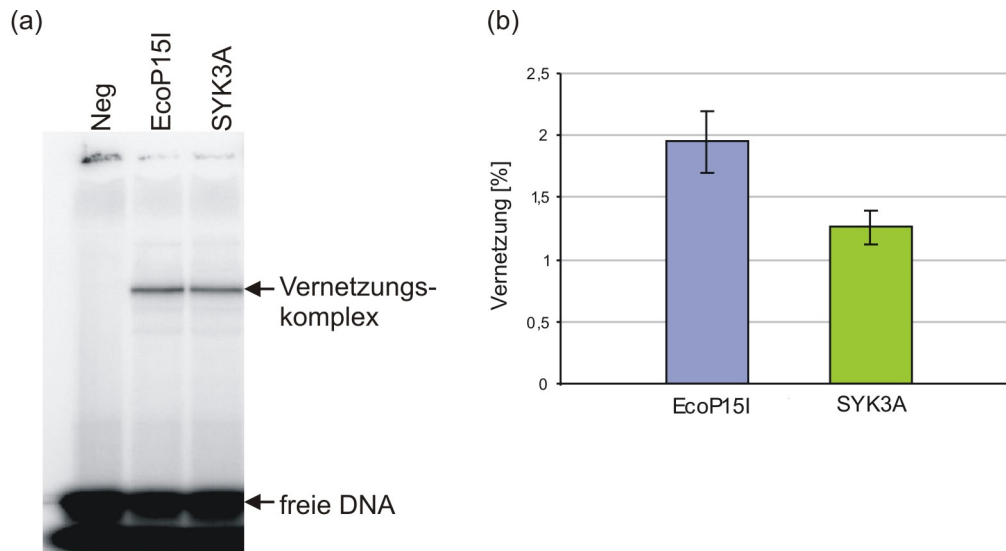


Abbildung 25: Autoradiographisches Bild der SDS-PAGE und quantitative Auswertung der Vernetzungsreaktion von EcoP15I und der Mutante SYK3A.

Die Enzyme wurden mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid-Duplex vernetzt, der an der Position A2 des Erkennungsortes mit p-APB modifiziert war. In (a) ist die SDS-PAGE der Vernetzungsreaktion dargestellt mit Neg als Negativkontrolle ohne Enzymzugabe. (b) stellt die quantitative Auswertung der Vernetzungsreaktion dar. Es wurde der Mittelwert aus fünf unabhängigen Versuchen unter Angabe der Standardabweichung ermittelt.

2.4 Elektronenmikroskopische Darstellung von EcoP15I

Um die Funktionsweise eines Enzyms verstehen zu können, ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von großer Bedeutung. Sind die komplexen molekularen und strukturellen Zusammenhänge bekannt, kann dieses Wissen zur Optimierung des Enzyms mit Hilfe des Protein-Engineering genutzt werden. Bislang sind nur wenige strukturelle Daten für Typ I und II Restriktionsendonukleasen verfügbar (siehe Abschnitt 1.3). Für die Typ III Restriktionsendonukleasen existiert keine dreidimensionale Struktur.

Versuche, die Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I zu kristallisieren, schlugen bisher fehl. Mit einem Molekulargewicht von ca. 407 kDa [31] ist das Protein eventuell zu groß für diese Anwendung. Für größere Proteine hat sich die Kryo-Elektronenmikroskopie als eine bessere Methode der dreidimensionalen Darstellung bewährt. Ohne die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist die Berechnung einer *ab initio* Struktur notwendig. Erste Versuche, die zu einer solchen Struktur führen sollen, wurden bereits durchgeführt. Da der gesamte Arbeitsprozess bestehend aus Datensammlung, -Auswertung und anschließender computergestützten Berechnung der dreidimensionalen Struktur sehr arbeits- und zeitintensiv ist, können in dieser Arbeit nur vorläufige Daten, die aus ersten Sammlungen und anschließender Auswertung einzelner Partikel resultieren, gezeigt werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die elektronenmikroskopische Darstellung war die maximal mögliche Reinheit der zu untersuchenden Probe, da die weitere Datenverarbeitung auf der Akkumulation vieler Einzelpartikel basierte. Aus diesem Grund wurden stets frisch gereinigte EcoP15I-Protein Fraktionen benutzt. Ebenso wurde auf eine Dialyse verzichtet, da Glyzerin die Probenaufbereitung stört. Um einen möglichst stabilen EcoP15I-Komplex zu erhalten, wurde das Enzym mit einem spezifischen DNA-Oligonukleotid-Duplex (60-1, 60 bp Länge, ein EcoP15I Erkennungsort) in Anwesenheit von nicht-hydrolysierbarem Adenylyl-Iminodiphosphat (AMP-PNP) bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Direkt im Anschluss daran erfolgte das Auftragen auf das mit einem Kohlefilm beschichtete Kupfer-Gitter. Zur Berechnung einer initialen Struktur von EcoP15I wurde das Enzym mit dem Schwermetallsalz Uranylacetat (2%) negativ kontrastiert. Ein Film des Salzes legt sich dabei auf die Oberfläche der Moleküle. Anschließend wurde die Qualität der Färbung am Elektronenmikroskop überprüft. Die Abbildung 26 zeigt einen typischen Mikrographen. Aufgrund der Negativkontrastierung erscheinen die EcoP15I Proteine als helle Partikel. Auf einem Mikrograph befanden sich ungefähr 100 Partikel, die manuell ausgewählt wurden. Das Sammeln der einzelnen Partikel und die weitere computergestützte Berechnung erfolgte durch Herrn Dr. Jan Giesebrecht am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Charité Berlin.

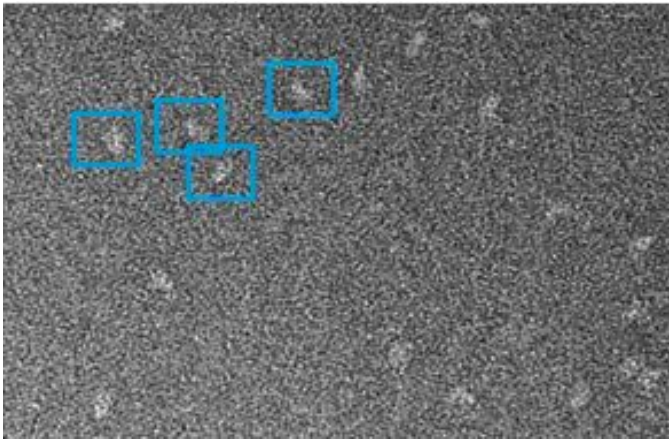


Abbildung 26: Ausschnitt eines typischen Mikrographen mit EcoP15I Partikeln.

Die EcoP15I Partikeln erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild aufgrund der Negativkontrastierung mit 2 % Uranylacetat als helle Partikel. Einige der EcoP15I-Partikel wurden mit einem blauen Rahmen markiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einer CCD-Kamera am Elektronenmikroskop „Spirit“ (Tecnai) mit 120 kV am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin. Die Vergrößerung betrug 57000 fach.

Die Abbildung 26 zeigt deutlich, dass sich die Partikel nur schwer vom Hintergrund unterscheiden ließen. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses der Einzelpartikel wurden über 3000 verschiedene Partikel gesammelt und in eine erste Berechnung der zweidimensionalen Struktur einbezogen. Partikel mit gleicher Orientierung wurden aufsummiert und anschließend in 100 Klassendurchschnitte eingeteilt, die in der Abbildung 27 dargestellt sind.

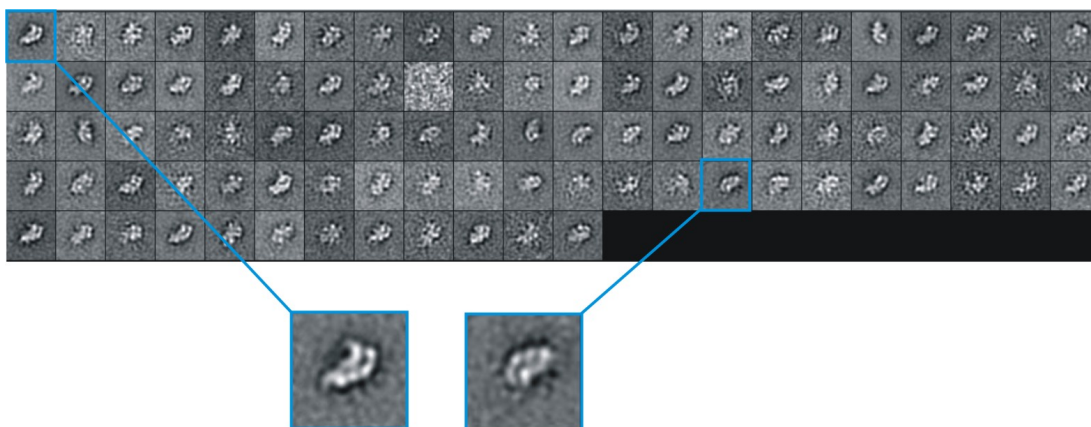


Abbildung 27: Berechnete Klassendurchschnitte der EcoP15I-Partikel.

3148 selektierte Partikelbilder, aus denen 100 Klassen durch Mittelung der ähnlichsten Partikel erstellt wurden. Zwei Klassen sind vergrößert dargestellt.

Die einzelnen Klassendurchschnitte zeigen eine ovale oder nierenartige Form der Partikel. Aufgrund der Verbesserung der Signal-Rausch-Verhältnisses konnten erste Strukturen von EcoP15I dargestellt werden. Zwei verschiedene Abbildungen wurden in einer vergrößerten Ansicht unterhalb der Klassendurchschnitte gezeigt. In der linken Vergrößerung sind bogenförmige Rundungen zu sehen, die in der Mitte eine schwarze Vertiefung aufweisen. Die rechte Vergrößerung zeigt EcoP15I in einer anderen Ansicht, wobei eine genaue Beurteilung der Richtungsänderung nicht möglich ist. In dieser Darstellung sind die oben genannten Rundungen nicht zu sehen.

Weitere Erkenntnisse in Bezug auf die Zusammensetzung der Untereinheiten ist auf dieser Stufe noch nicht möglich. Um eine erste dreidimensionale Struktur von EcoP15I zu erhalten, ist es notwendig, mehrere tausend einzelne Partikel in die Berechnung der Klassendurchschnitte einzubeziehen. Je besser das Signal-Rausch-Verhältnis in diesen Klassen ist, desto genauer kann auch die initiale Struktur berechnet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Restriktionsendonuklease EcoP15I durchaus zur Berechnung einer dreidimensionalen Struktur mittels Elektronenmikroskopie eignet. Es waren deutlich einzelne Partikel auf den Mikrographen zu identifizieren, die in der weiteren Berechnung zu sinnvollen Klassendurchschnitten führten. Es besteht nun die Möglichkeit, den bislang unbekannten strukturellen Aufbau der Typ III Restriktionsendonukleasen aufzuklären und das daraus resultierende Wissen für weiterführende Projekte anzuwenden.

3 DISKUSSION

Durch Nutzung des EcoP15I-kodierenden Überexpressionsplasmids pQEP15 konnten in dieser Arbeit erste Daten über strukturelle Domänen in der Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I erarbeitet werden. Die Insertion von maximal 29 Aminosäuren wurde von EcoP15I toleriert, wohingegen schon eine geringe Anzahl deletierter Aminosäuren (vier und sieben Aminosäuren) zu einer vollständigen katalytischen Inaktivierung des Enzymkomplexes führte. Außerdem konnte durch Vernetzung von EcoP15I mit spezifischer DNA erstmalig gezeigt werden, welche Regionen von EcoP15I in engem Kontakt mit der DNA stehen. Die ersten hier vorgestellten Daten zur dreidimensionalen Rekonstruktion des Enzymkomplexes zeigten deutlich, dass EcoP15I elektronenmikroskopisch dargestellt werden konnte und sich somit für die Berechnung einer dreidimensionalen Struktur eignet.

3.1 Der strukturelle Aufbau der beiden Untereinheiten der Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I

Zur Identifizierung von strukturellen Domänen in EcoP15I wurde die limitierte Proteolyse angewendet. Die Peptidfragmente, die dem proteolytischen Abbau durch Trypsin standhielten, konnten durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Die Ergebnisse der limitierten Proteolyse sind schematisch in Abbildung 28 zusammengefasst. In Abwesenheit von DNA wurde sowohl die Mod- als auch die Res-Untereinheit degradiert. Die Mod-Untereinheit war innerhalb von fünf bis 30 Minuten nicht mehr nachweisbar (vgl. Abbildung 4). Die Degradation lässt auf das Fehlen von stabil gefalteten Domänen schließen. Die Mod-Untereinheit hat in Lösung scheinbar einen wenig strukturierten, dynamischen Aufbau. Durch proteolytischen Verdau der Res-Untereinheit konnte dagegen gezeigt werden, dass sie offensichtlich aus zwei stabil gefalteten Fragmenten besteht.

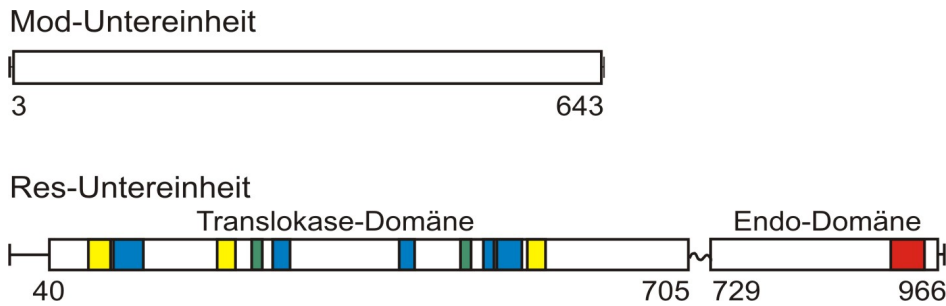


Abbildung 28: Schematische Darstellung der identifizierten Domänen der EcoP15I Mod- und Res-Untereinheit nach Trypsin-Verdau.

Die Mod-Untereinheit (644 AS) wurde in fast ihrer gesamten Größe (Aminosäuren 3 bis 643) geschützt. Die Res-Untereinheit (970 AS) besteht aus zwei stabil gefaltete Domänen, der Translokase-Domäne (Aminosäuren 40 bis 705) und der Endo-Domäne (Aminosäuren 729 bis 966). Die Position der putativen Helikase-Motive und des endonukleolytischen Motivs sind als farbige Balken gekennzeichnet [70].

Ohne ATP zeigte der tryptische Verdau in Anwesenheit spezifischer DNA (DNA mit mindestens einem EcoP15I Erkennungsort), dass die Mod-Untereinheit auf diese Weise in fast ihrer kompletten Größe von 644 Aminosäuren geschützt werden konnte. In der massenspektrometrischen Analyse wurde der Bereich zwischen Aminosäure 3 und 643 identifiziert. Die gleichzeitige Anwesenheit von ATP und unspezifischer DNA schützte die Mod-Untereinheit ebenfalls vor Abbau, wenn auch in einem geringeren Maße als spezifische DNA. Es scheint, dass ATP eine Konformationsänderung in EcoP15I bedingt, aufgrund dessen sich die Bindung sowohl an spezifische als auch unspezifische DNA erhöht [30,82,83]. ATP ist demzufolge ein wichtiger Kofaktor für das Enzym, um in den Prozess der DNA-Restriktion zu starten, da der Prozess der DNA-Methylierung ATP-unabhängig ist [42].

In früheren Versuchen haben Ahmad *et al.* [83] versucht, DNA-bindende Bereiche in der EcoP15I Mod-Untereinheit zu identifizieren. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen fanden die Autoren mittels limitierter Proteolyse durch die *Staphylococcus* V8 Protease und in Anwesenheit spezifischer DNA zwei stabile Fragmente: ein N-terminales Fragment mit einer Größe von 30 kDa und ein C-terminales Fragment mit einer Größe von 50 kDa. Führten die Autoren mit der proteolytisch verdauten Mod-Untereinheit DNA-Bindungsversuchen mittels Gel-Shift durch, detektierten sie nur einen Komplex auf der Höhe der kompletten Mod-Untereinheit. Ahmad *et al.* begründeten dieses Ergebnis damit, dass beide Fragmente in Anwesenheit von DNA assoziiert bleiben und dementsprechend nicht als getrennte Banden sichtbar sind. Bemühungen, die Fragmente mittels Gelfiltration voneinander zu trennen, waren jedoch nicht erfolgreich.

Obwohl bereits publizierte strukturelle Daten davon ausgehen, dass DNA-Methyltransferasen, einschließlich der EcoP15I Mod-Untereinheit, modular aus zwei Domänen aufgebaut sind, konnten in der vorliegenden Arbeit durch limitierter Proteolyse mit Trypsin keine stabil gefalteten Domänen identifiziert werden. Mit Hilfe der kürzlich entwickelten Methode des „*Combinatorial Domain Hunting*“ sollte nochmals nach globulären Domänen in der Mod-Untereinheit gesucht werden. Die Methode basiert auf der Identifizierung und anschließenden Expression stabiler und funktioneller Domänen in komplexen Proteinen, die in löslicher Form gewonnen werden können [84].

In Anwesenheit von spezifischer DNA und ATP war der proteolytische Verdau der Res-Untereinheit wesentlich verlangsamt. Es entstanden jedoch die gleichen Fragmente wie durch Verdau in Abwesenheit von DNA. Auffallend ist die Tatsache, dass im Gegensatz zum Fehlen von ATP in dessen Anwesenheit die Res-Untereinheit, ebenso wie die Mod-Untereinheit, auch mit unspezifischer DNA vor Abbau geschützt ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Anwesenheit von ATP eine unspezifische DNA-Bindung von EcoP15I fördert. Aufgrund der massenspektrometrischen Analyse der Peptidfragmente konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Anwesenheit von DNA und Kofaktoren die gleichen Fragmente entstehen: ein großes N-terminales Fragment mit der Größe von 77-79 kDa, korrespondierend zu den Aminosäuren 40 bis 705, und ein kleineres C-terminales Fragment mit einer Größe von 27-29 kDa, korrespondierend zu den Aminosäuren 723 bis 966 (vgl. Abbildung 28).

McClelland und Szczelkun [70] führten DNA-Sequenzvergleiche von bereits charakterisierten und noch unbekannten offenen Leserahmen der Typ I HsdR-Untereinheiten und Typ III Res-Untereinheiten durch. Auf diese Weise identifizierten sie zahlreiche putative Motive, die an der ATP-Bindung und -Hydrolyse und/oder DNA-Translokation beteiligt sein könnten. Die Helikase- oder Translokase-Motive befanden sich dabei im N-terminalen Bereich der Res-Untereinheit. Basierend auf der Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm PSIPRED [85] und vorangegangenen Analysen von Davies *et al.* [12] unterteilten die Autoren den N-terminalen Teil in zwei Domänen. Diese Domänen enthalten die sieben klassischen Helikase-Motive [14] und vier weitere homologe Regionen, die eine Rolle in der DNA-Translokation spielen könnten [70]. Eine dritte Domäne enthält das katalytische Motiv [31]. Überträgt man die oben genannten Erkenntnisse auf die Res-Untereinheit von EcoP15I, so befinden sich in der postulierten Translokase-Domäne alle funktionellen Motive der Motor-Einheit (vgl. Abbildung 28). Möglicherweise interagieren die beiden von McClelland und

Szczelkun postulierten Domänen sehr stark miteinander, was dazu führen könnte, dass sie nur selten proteolytisch gespalten werden. Einen möglichen Hinweis darauf geben die transient auftretenden feinen Banden (vgl. Abbildung 4, Bahnen 6 und 10), welche nach massenspektrometrischer Analyse als N-terminal verkürzte Versionen der Motor- oder Translokase-Domäne zugeordnet werden konnten. Die 27 bis 29 kDa große C-terminale Domäne enthält das katalytische Zentrum und wird somit als Endo-Domäne bezeichnet (vgl. Abbildung 28). Beide strukturellen Domänen sind durch einen flexiblen Linker mit einer Länge von 23 Aminosäuren miteinander verbunden.

Modular aufgebaute Proteine enthalten voneinander unabhängige, gefaltete Domänen, die durch flexible Linker miteinander verbunden sind [86]. Flexible Linkerregionen sind bereits für eukaryotische und prokaryotische Proteine beschrieben worden. Die primäre Funktion des Linkers ist es, eine ungehinderte, räumliche Flexibilität der Domänen zu ermöglichen [87]. Ebenso kann erst die sequenzspezifische Bindung eines Proteins in der Linkerregion zur strukturellen Umformung führen, sodass einzelne Domänen in eine funktionsfähige Position gebracht werden, wie zum Beispiel bei Zink-Finger Proteinen [88]. Erst dadurch können die durch einen Linker verbundenen Zink-Finger in die richtige Position gedreht werden, um in der großen Grube der DNA zu binden. Bei EcoP15I führte die Deletion der gesamten Linkerregion zum Verlust der DNA-Spaltaktivität des Enzyms. Die DNA-Bindung, -Methylierung und ATPase-Aktivität waren jedoch nicht beeinträchtigt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch Abwesenheit des Linkers eine mögliche Interaktion zwischen der Translokase- und der Endo-Domäne der Res-Untereinheit inhibiert wird und somit die Endo-Domäne nicht mehr an die vorgesehene Spaltposition gebracht oder gedreht werden kann.

Insertionen in Regionen, die unstrukturierte Bereiche kodieren, lassen die gefalteten Domänen in der Regel intakt. Werden im Gegensatz dazu Insertionen in Regionen eines Gens eingebracht, welches vollständig strukturierte Domänen kodiert, erfolgt eine mögliche Synthesisierung von falsch gefaltete Proteine, welche die Zelle anschließend rasch abbaut [86]. Auch EcoP15I tolerierte die in und um die vorausgesagte Linkerregion eingeführten Insertionen. Alle Mutanten behielten ihre DNA-Spaltaktivität (vgl. Abbildung 10). Im Gegensatz dazu führte jede Deletion im und am Linker zur Inaktivierung von EcoP15I. Es kann daraus geschlussfolgert werden, dass der Linker einen wesentlichen Einfluss auf die DNA-Spaltaktivität von EcoP15I hat und die minimale Länge von 23 Aminosäuren nicht unterschritten werden darf.

3.2 Eine potentielle Stelle der Protein-Protein-Interaktion zwischen beiden Untereinheiten von EcoP15I

EcoP15I besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die mittels Protein-Protein-Kontakte miteinander verbunden sein müssen. Eine mögliche Stelle der Interaktion zwischen beiden Untereinheiten könnte der Bereich zwischen den Aminosäuren 665 und 671 in der Res-Untereinheit darstellen. In diesem Bereich sind bei den Mutanten Nh4 und Nh7 zusätzliche Aminosäuren inseriert. Die Aufreinigung der Restriktionsendonuklease EcoP15I erfolgt in zwei Reinigungsschritten [19]. Der erste Schritt beinhaltet die Affinitätschromatographie, wobei der His₆-Tag an Ni-NTA-Agarose gebunden wird. Der zweite Reinigungsschritt geschieht über Ionen-Austausch-Chromatographie. Hierbei bindet das Enzym mit positiv geladenen Aminosäuren oder Bereichen an das negativ geladene Säulenmaterial (Heparin-Sepharose). Während beiden Schritten wird vorrangig die Res-Untereinheit an das Chromatographiematerial gebunden, die Mod-Untereinheit wird aufgrund von Protein-Protein-Wechselwirkungen zusammen mit der Res-Untereinheit aufgereinigt. Innerhalb der Aufreinigungsprozedur der Mutanten Nh4 und Nh7 konnte eine gestörte Interaktion zwischen der Mod- und Res-Untereinheit beobachtet werden, da die Mod-Untereinheit bereits nach Probenauftrag im Durchfluss wieder zu finden war. Auch nach elektrophoretischer Auftrennung der eluierten Proteine wurde ein deutliches Ungleichgewicht zwischen der Res- und der Mod-Untereinheit in den gesammelten Protein-Fractionen festgestellt (vgl. Abbildung 12). Bei beiden Mutanten war die Mod-Untereinheit unterrepräsentiert. Der Bereich zwischen Aminosäuren 665 bzw. 668 und 671 in der Res-Untereinheit stellt möglicherweise eine potentielle Interaktionsstelle zwischen den beiden Untereinheiten dar, da diese Aminosäuren in den Mutanten Nh4 und Nh7 verdoppelt wurden. Wenn an dieser Stelle die Interaktion zwischen der Mod- und Res-Untereinheit vermittelt wird, führt die Verdopplung offensichtlich dazu, dass zwei potenzielle Bindungsbereiche entstehen. Möglicherweise behindern sich zwei Mod-Untereinheiten so stark, dass eine verminderte Bindung beide Untereinheiten während der Ionen-Austausch-Chromatographie voneinander trennt. Aufgrund dessen enthielten die photometrisch bestimmten Proteinkonzentrationen dieser beiden Mutanten demzufolge weniger komplette EcoP15I-Enzymkomplexe als die Enzympräparation des Wildtypenzym.

3.3 DNA-Protein-Interaktion von EcoP15I mit spezifischer DNA

Mit welchen konkreten Regionen die Typ III Restriktionsendonukleasen den Kontakt zum DNA-Erkennungsort aufbauen, wurde bislang experimentell noch nicht nachgewiesen. Zur Identifizierung von DNA-Protein-Interaktionsstellen zwischen EcoP15I und spezifischer DNA wurden in dieser Arbeit Vernetzungsstudien durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Positionen des EcoP15I Erkennungsortes entweder mit den photoreaktiven Vernetzern X/Y oder p-APB modifiziert. Durch Modifikation mit X/Y können basenspezifische, mit p-APB Phosphatrückgrat-spezifische Kontakte identifiziert werden. Der Vorteil der Vernetzer X/Y ist ihre geringe Reichweite von 3 bis 5 Å, weshalb sie auch als „Nulllängen-Vernetzer“ bezeichnet werden. Durch Belichtung mit einem Laser der Wellenlänge 325 nm bildet die reaktive Gruppe des Vernetzers eine kovalente Verknüpfung zwischen der modifizierten Base und der Aminosäure des Proteins, die sich in der Reichweite befindet. Der Vernetzer p-APB dagegen hat eine größere Reichweite von 11 Å. Durch Belichtung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bildet auch hier die reaktive Gruppe eine kovalente Verknüpfung zwischen der modifizierten Base und der Aminosäure im Protein, die sich in der Reichweite befindet.

Zur Identifizierung der basenspezifischen Kontakte zwischen EcoP15I und spezifischer DNA wurden zunächst alle Basen des EcoP15I Erkennungsortes sukzessive mit X oder Y ausgetauscht. Nach Analyse der Vernetzungsprodukte zeigte sich, dass die Positionen A2 und A5 ein Vernetzungsprodukt mit EcoP15I bildeten (vgl. Abbildung 16). Die Ausbeute dieser Reaktion betrug jedoch lediglich 2 %. Da aufgrund der geringen Ausbeute und der langen Belichtungsdauer (45 min) die Herstellung einer präparativen Menge an Vernetzungskomplex zu zeitintensiv gewesen wäre, wurde die Vernetzung mit Hilfe von p-APB durchgeführt. Auch in diesem Fall wurden die einzelnen Positionen des EcoP15I Erkennungsortes sukzessive mit p-APB modifiziert. Die Analyse der Vernetzungsprodukte ergab hierbei die Komplexbildung der modifizierten Positionen A2 und G6 mit EcoP15I. Da mit dem Oligonukleotid-Duplex A2 mit beiden Vernetzern (X/Y und p-APB) ein Komplex aus EcoP15I und DNA detektiert werden konnte, fokussierten sich alle weiteren Versuche auf diese Position. Die Vernetzungsausbeute der Reaktion betrug ebenfalls 2 %. In früheren Versuchen zeigten andere Restriktionsendonukleasen im Vergleich dazu deutlich höhere Ausbeuten. Die Typ II Restriktionsendonuklease EcoRII konnte mit basensubstituierter DNA zu 45 % vernetzt werden [76]. Ebenso wurde die Homing Endonuklease PI-SceI mit Phosphatrückgrat-modifizierter DNA zu 40 % vernetzt [81]. Die geringen Ausbeuten an DNA-EcoP15I-Vernetzungsprodukt lassen den Schluss zu, dass EcoP15I ein sehr dynamischer

Enzymkomplex sein muss, der nach Bindung an den Erkennungsort keine starre molekulare Form annimmt.

Die Herstellung einer präparativen Menge des Vernetzungskomplexes von EcoP15I mit Phosphatrückgrat-modifizierter DNA war experimentell im eigenen Labor in kurzer Zeit durchführbar (Belichtungszeit 2 min). Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse der Peptid-DNA-Komplexe. Dabei konnten drei verschiedene Kontakte zwischen EcoP15I und der modifizierten DNA identifiziert werden, wobei ein Kontakt über die Mod-Untereinheit und zwei Kontakte über die Res-Untereinheit ausgebildet wurden.

Da die Mod-Untereinheit allein auch als Methyltransferase aktiv ist [83], ist es offensichtlich, dass sie an der DNA-Bindung beteiligt sein muss. Der identifizierte Bereich der Interaktion zwischen Mod-Untereinheit und DNA liegt zwischen den Aminosäuren 628 und 638 nahe dem C-terminalen Ende. Schon in früheren Versuchen konnten Ahmad *et al.* zeigen, dass die Mod-Untereinheit mit einem DNA-Duplex vernetzt werden konnte, in dem die Position T5 des Erkennungsortes durch Austausch gegen ein Bromodesoxyuridin (Bromouracil) modifiziert wurde [83]. Die Spezifität der Bindung an diesen Duplex konnten sie durch Zugabe eines 20-fachen Überschusses an unmodifiziertem Duplex beweisen, der die Vernetzung verhinderte. Der vernetzte Komplex aus DNA-Duplex und Mod-Untereinheit wurde mittels *Staphylococcus* V8 Protease verdaut. Auf diese Weise zeigten die Autoren, dass der DNA-Duplex mit einem 50 kDa großen Fragment vernetzt zu sein scheint, das dem C-terminalen Bereich der Mod-Untereinheit zugeordnet wurde [36]. Eine nähere Identifizierung der an der Interaktion beteiligten Aminosäure wurde nicht durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit interagierte ebenfalls der C-terminale Teil der Mod-Untereinheit mit dem DNA-Erkennungsort. Darüber hinaus konnte mittels Massenspektrometrie die Aminosäure S635 als die mit der Position A2 des EcoP15I Erkennungsortes interagierende Aminosäure bestimmt werden.

Zusätzlich zu der DNA-Protein-Interaktionsstelle in der EcoP15I Mod-Untereinheit wurden in dieser Arbeit zwei Bereiche in der Res-Untereinheit identifiziert, die ebenfalls an der Interaktion zwischen DNA-Erkennungsort und Enzym beteiligt zu sein scheinen. Im ersten Bereich zwischen den Aminosäuren 245 bis 251 interagiert sehr wahrscheinlich Y248 mit der Position A2 des EcoP15-Erkennungsortes. Erwähnenswert ist, dass sich diese Aminosäure innerhalb des konservierten Motivs III der Helikase-Motive der Superfamilie 2 mit bisher unbekannter Funktion befindet [70].

Dieses Motiv bildet über Wasserstoffbrücken einen Kontakt zum hochkonservierten Motiv II (Walker B), das an der Hydrolyse von ATP beteiligt ist [89]. Bei Enzymen mit Helikase-Motiven der Superfamilie 1 baut das Motiv III neben dem Kontakt zu Motiv II auch Wasserstoffbrücken zu Basen der DNA auf [70]. Die zweite Position in der Res-Untereinheit, die durch die Vernetzungsstudie identifiziert werden konnte, ist die Aminosäure K421. Diese Aminosäure befindet sich 20 Aminosäuren C-terminal des Motivs IV. Obwohl innerhalb der Typ I und III Restriktionsendonukleasen in diesem Bereich keine signifikanten Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz gefunden werden konnten, wird die Ausbildung eines Kontakts zur DNA über dieses Motiv nicht ausgeschlossen [70]. Für beide Bereiche um die Aminosäuren Y248 und K421 wird somit postuliert, dass sie den Kontakt zur DNA herstellen. Auch wenn sich K421 in einer gewissen Entfernung zum Motiv IV befindet, geben diese Ergebnisse erste Hinweise darauf, mit welchen Aminosäuren EcoP15I den Kontakt zum Erkennungsort herstellt.

Um zu beweisen, dass die drei Aminosäuren S635, Y248 und K421 mit dem Phosphatrückgrat der DNA interagieren, wurden sie mittels ortspezifischer Mutagenese durch Alanin ersetzt. Nach Analyse der Vernetzungsreaktion zeigte sich für die Mutante SYK3A eine etwas geringere, aber signifikant veränderte Vernetzungsausbeute von 1,45 % im Vergleich zum EcoP15I Wildtypenzym von 1,95 % (vgl. Abbildung 25). Aufgrund der nur leicht verringerten Ausbeute schlussfolgern wir, dass diese Aminosäuren an der Phosphatrückgrat-Bindung beteiligt sind, allerdings nicht die alleinigen Interaktionsstellen sind. Dies beweisen auch die dem EcoP15I Wildtypenzym entsprechende DNA-Bindungs-fähigkeit sowie DNA-Spaltaktivität der Mutante SYK3A. EcoP15I bindet nicht nur mit einzelnen Aminosäuren an den DNA-Erkennungsort, sondern offensichtlich mit Bindungsbereichen, die mehrere Aminosäuren umfassen. Die hier identifizierten Aminosäuren stellen somit die engsten Kontaktstellen zwischen DNA-Erkennungsort und Protein dar. Demzufolge sind weitere Untersuchungen der DNA-Protein-Interaktion notwendig, um den Prozess der Interaktion zwischen EcoP15I und dem DNA-Erkennungsort aufklären zu können. Durch den zusätzlichen Austausch der benachbarten Aminosäuren mit Alanin könnte weiter aufgeklärt werden, ob dieser Bereich eine Rolle bei der Bindung des Erkennungsortes spielt. Ebenso würde die Analyse des Vernetzungskomplexes von EcoP15I mit Oligonukleotid-Duplexen mit modifizierter Position G6 des Erkennungsortes aufklären, ob sich diese Interaktionsstellen in der Nähe der in dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren befinden. Mit Hilfe der Vernetzer X und Y könnte nochmals versucht werden, eine analysierbare Menge an Vernetzungskomplex herzustellen, um den Bereich der basenspezifischen Interaktion einzuschränken.

Einen zusätzlichen Hinweis auf die Richtigkeit der DNA-Protein-Interaktion zwischen EcoP15I und spezifischer DNA kann durch die Ergebnisse von Crampton *et al.* gewonnen werden [47]. Mittels Rasterkraftelektronenmikroskopie stellten sie fest, dass EcoP15I drei DNA-Bindungsstellen ausbildet, wenn es an ein DNA-Substrat mit einem Erkennungsort gebunden hat. Ein Kontakt zur DNA wird über die TRD einer Mod-Untereinheit hergestellt. Dieser dient der spezifischen DNA-Erkennung. Zwei weitere Kontakte zur DNA werden mit jeweils einer der Res-Untereinheit hergestellt, die nach der DNA-Erkennung die DNA durch das Enzym schlaufen, um nach Kollision mit dem zweiten Enzymkomplex die Spaltung durchzuführen. Von den in dieser Arbeit identifizierten Kontakten befinden sich ebenfalls einer in der Mod- und zwei in der Res-Untereinheit. Beide Ergebnisse stimmen darin überein, dass EcoP15I mehrere Kontakte zu spezifischer DNA aufbaut.

Durchgeführte Gel-Shift-Experimente beweisen ebenfalls, dass auch die EcoP15I Res-Untereinheit an der DNA-Bindung beteiligt sein muss. Die K_D -Werte von 2 μM für die EcoP15I-Methyltransferase an spezifischer DNA zeigen, dass diese Bindung sehr schwach ist. Im Vergleich dazu bindet der gesamte EcoP15I Enzym-Komplex fast 200 mal fester an DNA. Mittels membran-gebundener Peptidbibliotheken konnten in der Res-Untereinheit DNA-bindende Bereiche identifiziert werden. In der Translokase-Domäne befanden sich vier und in der Endo-Domäne zwei Bereiche, die einen DNA-bindenden Charakter aufwiesen (K. Wyszomirski, unveröffentlichte Ergebnisse). Die in der Vernetzungsstudie gefundenen DNA-Protein-Bindungsstellen befinden sich nicht in diesen Bereichen. Dies lässt darauf schließen, dass EcoP15I verschiedene Regionen benutzt, um unspezifisch an DNA im allgemeinen oder spezifisch an den Erkennungsort zu binden. Diese Vermutung lässt sich anhand der Ergebnisse des Gel-Shift-Experimentes mit der Mutante SYK3A bestätigen, denn die DNA-Bindung war nach Einführung der Mutation nicht beeinträchtigt. Somit fügt die Identifizierung der drei DNA-Protein-Bindungsstellen daher weitere Bereiche, die an der spezifischen DNA-Erkennung durch EcoP15I beteiligt sind, hinzu.

Die Vermittlung einer sequenzspezifischen DNA-Bindung über die Mod-Untereinheit kann ebenso durch unsere Proteolyse-Ergebnisse bestätigt werden, da diese durch Anwesenheit von DNA mit mindestens einem EcoP15I-Erkennungsort vor tryptischen Abbau geschützt wurde. Durch Zugabe des Kofaktors ATP bilden sich darüber hinaus unspezifische DNA-Bindungen aus, da beide Untereinheiten vor Abbau geschützt waren. Aufgrund der Ergebnisse der Vernetzungsstudien lässt sich ebenso schlussfolgern, dass zusätzlich zur Mod-Untereinheit auch die Res-Untereinheit

Kontakte zum EcoP15I-Erkennungsort ausgebildet. In den bisher postulierten Reaktionsmechanismen bindet nur die Mod-Untereinheit spezifisch an den EcoP15I-Erkennungsort.

3.4 Protein-Engineering von EcoP15I

Das Protein-Engineering von EcoP15I sollte zu dem Ziel führen, den Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort zu vergrößern. Für weiterführende Analysen in der Transkriptomanalyse durch SuperSAGE wären Tag-Längen von mehr als 26 Basen von Vorteil, da die Sequenzinformationen direkt als Basis zur Synthese von siRNAs oder Hybridisierungs sonden für SuperSAGE-Arrays dienen könnte. EcoP15I spaltet doppelsträngige DNA 25 bis 26 Basen in 3'-Richtung nach dem Erkennungsort im A-Strang und 27 bis 28 Basen in 5'-Richtung nach dem Erkennungsort im T-Strang. Dies ist der bislang größte bekannte Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort. Experimentell wurde der Spaltort an drei verschiedenen linearen DNA-Substraten mit einem Erkennungsort [34] und an zirkulärer DNA mit zwei invers orientierten EcoP15I Erkennungsorten untersucht [31]. In dieser Arbeit wurde für die Spaltortbestimmung ein 281 bp langes PCR-Produkt hergestellt, welches zwei invers orientierte EcoP15I Erkennungsorte A und B enthält, die 82 bp voneinander entfernt sind ($d=82$ bp, vgl. Abbildung 8). Interessanterweise wurde dieses Substrat von EcoP15I an beiden Orten an unterschiedlichen Positionen gespalten. Ort A wurde nach 24 oder 25 Basen im A-Strang und nach 27 Basen im T-Strang gespalten. Ort B dagegen wurde nach 24 bis 26 Basen im A-Strang und nach 26 bis 28 Basen im T-Strang geschnitten (vgl. Abbildung 9). Der Erkennungsort A wird also mit geringerer Flexibilität gespalten als der Erkennungsort B. Die in dieser Arbeit identifizierten Spaltpositionen stimmen mit den bereits publizierten Daten sehr gut überein. Darüber hinaus zeigte EcoP15I in den Experimenten dieser Arbeit eine höhere Flexibilität als bisher bekannt. Die Tatsache, dass sich die Spaltpositionen von Ort A zu denen von Ort B unterscheiden, liegt möglicherweise an den Umgebungssequenzen des 281 bp PCR-Substrates. In 5' Richtung des Ortes A befindet sich eine GC-reiche Region und in 5' Richtung des Ortes B eine AT-reiche Region. Dies kann möglicherweise zu unterschiedlichen lokalen DNA-Strukturen führen, welche die Flexibilität des Enzyms beeinflussen. Eine Überprüfung des Spaltortes an einem DNA-Substrat mit einer anderen Umgebungssequenz zum Erkennungsort wäre notwendig, um deren Einfluss ausschließen zu können. Im Gegensatz zu $d=82$ bp zeigte EcoP15I bei der Spaltung der nicht-optimalen Substraten $d=23$ bp und $d=0$ bp keine Flexibilität. Hier wurden nur jeweils einzelne Positionen

gespalten. Das DNA-Substrat $d=23$ bp, bei dem die beiden Erkennungsorte 23 bp voneinander entfernt lagen, spaltete EcoP15I an beiden Orten 24 Basen nach dem Erkennungsort im A-Strang und 26 Basen nach dem Erkennungsort im T-Strang. Das DNA-Substrat $d=0$ bp, bei dem die beiden invers orientierten Erkennungsorte direkt aneinander stoßen, spaltete EcoP15I an beiden Orten 25 Basen nach dem Erkennungsort im A-Strang und 27 Basen nach dem Erkennungsort im T-Strang. Wenn das Substrat $E=1$ zur Spaltung angeboten wurde, spaltete EcoP15I in bekannter Flexibilität (vgl. Abbildung 8 und 9). Ein möglicher Grund für den Verlust der Flexibilität könnte die eingeschränkte Translokation sein. Typ III Restriktionsendonukleasen sind, ebenso wie Typ I Restriktionsendonukleasen, ATP-abhängige Enzyme [10]. Die Spaltung erfolgt nach einer ATP-abhängigen DNA-Translokation [6]. Ob nun eine fehlende oder eingeschränkte Translokation die Ursachen für die eingebüßte Flexibilität der DNA-Spaltung ist, könnte durch einem ATPase-Assay geklärt werden. Im diesem Fall wäre die ATP-Hydrolyse vermindert.

Biochemische und strukturelle Analyse von Restriktionsendonukleasen, die wie EcoP15I doppelsträngige DNA ebenfalls außerhalb ihrer Erkennungssequenz spalten (Typ I, IIS und IIG Restriktionsendonukleasen) haben gezeigt, dass diese Enzyme auch aus separaten Domänen bestehen, die für die DNA-Bindung und Spaltung notwendig sind [90,91]. Daraufhin wurde postuliert, dass diese Endonukleasen durch Rekombination der Endo-Domäne mit DNA-Bindungsdomänen unterschiedlicher Sequenzspezifität entstanden sind [92]. Die Typ IIS Restriktionsendonuklease FokI besteht ebenfalls aus zwei funktionellen Domänen [91]. Die Erkennungsdomäne befindet sich im N-terminalen Teil und die katalytische Domäne im C-terminalen Teil der Aminosäuresequenz [93]. Beide Domänen sind ähnlich wie bei EcoP15I über einen Linker miteinander verbunden [91], der in diesem Falle eine α -helikale Struktur ausbildet. Die Autoren vermuteten, dass diese α -Helix den Abstand zwischen Erkennungsort und Spaltort determiniert. Wie EcoP15I erkennt auch FokI eine asymmetrische DNA-Sequenz (5'-GGATG-3') und spaltet diese im oberen Strang neun Basen in 3'-Richtung und im unteren Strang 13 Basen in 5'-Richtung nach dem Erkennungsort. Durch Insertion von vier und sieben zusätzlichen Aminosäuren in den α -helikalen Bereich des Linkers, was einer und zwei Windungen entspricht, wurden die Spaltstellen um eine Base weiter in 3'-Richtung verschoben [94]. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde der Versuch unternommen, durch genetisches Engineering den Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort zu vergrößern. Grundlage der genetischen Manipulation sind die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Domänenstruktur von EcoP15I. Die Res-Untereinheit ist aus zwei Domänen aufgebaut,

die durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Nach Analyse der Aminosäuresequenz hinsichtlich ihrer möglichen sekundären Struktur besteht der Linker aus einer unstrukturierten Region. N-terminal der Linkerregion befindet sich ein Bereich mit α -helikalem Charakter. Durch Insertion zusätzlicher α -Helix-Windungen, ähnlich wie bei der Typ IIS Restriktionsendonuklease FokI [94], konnte eine Verschiebung der präferierten Spaltposition erreicht werden. Die weitere Diskussion bezieht sich auf den Erkennungsort B, da nur an diesem Ort Veränderungen festgestellt wurden. Ort A blieb bei allen untersuchten Mutanten und dem Wildtypenzym unverändert. Das EcoP15I Wildtypenzym spaltete den A-Strang in 3'-Richtung bevorzugt nach 24 sowie 25 Basen und mit geringerer Effizienz nach 26 Basen. Der T-Strang wurde mit gleicher Effizienz an den Positionen 26 bis 28 in 5'-Richtung nach dem Erkennungsort gespalten. Durch Insertion von einer α -helikalen Windung in den C-terminalen Bereich (Ch4) wurden alle Positionen mit gleicher Effizienz gespalten. Die Insertion von zwei oder drei zusätzlichen Windungen (Ch7, Ch11) führten zu dem Ergebnis, dass die Positionen, die am weitesten vom Erkennungsort entfernt lagen, gespalten wurden. Durch weitere Insertion konnte dieser positive Effekt nicht weiter verstärkt werden. Offensichtlich bedingten hier die zusätzlichen Windungen keine weitere Entfernung der beiden Domänen, sondern sie wurden an die Proteinoberfläche verlagert, so dass sich dadurch der Abstand wieder verringern konnte. Die Mutanten Ch18 und Ch29 verhielten sich genau wie die Mutante Ch4. Durch Verlängerung des unstrukturierten Linkers an sich konnten nur marginale Effekte erzielt werden. Dieses Ergebnis spricht für die Insertion von zusätzlichen Aminosäuren in eine strukturierte Region, denn unstrukturierte Bereiche werden, genau wie zu viele α -Helix-Windungen einfach an die Proteinoberfläche verlagert, sodass keine räumliche Trennung der Domänen erfolgen kann. Dass nur Insertionen in den C-terminalen Teil der α -Helix sinnvoll sind, zeigen die Spaltortbestimmungen der Nh-Mutanten. Bei diesen war durch die Insertion von ein oder zwei zusätzlichen Windungen (Nh4, Nh7) ein gegensätzlicher Effekt zu beobachten. Die genetisch veränderten Enzyme spaltete an den Positionen, die dem Erkennungsort am nächsten waren. Inwiefern sich Insertionen in den mittleren Bereich der α -Helix auf den Spaltort auswirken, müsste durch weitere Mutationen geklärt werden.

Da der Spaltort diverser EcoP15I-Mutanten nur innerhalb des A-Stranges weiter vom Erkennungsort entfernt werden konnte, sind sie für die weiteren Anwendungen in der Transkriptomanalyse durch die SuperSAGE nicht vorteilhaft einsetzbar. Bei dieser Methode werden die durch die Spaltung mit EcoP15I entstehenden 5'-Überhänge mit Hilfe einer Polymerase aufgefüllt. Dementsprechend beschränkt sich bei allen hier

analysierten Mutanten der maximale Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort nach der Untersuchung der Spaltung am DNA-Substrat d=82 bp auf eine Länge von 27 Basen für Ort A und 28 Basen für Ort B.

Im Falle von FokI wurden nicht nur Insertionsmutanten generiert, sondern auch Deletionsmutanten [95]. Die maximale Insertion betrug 23 Aminosäuren. Diese hatte keinen Einfluss auf die Aktivität oder die Sequenzspezifität des Enzyms. Die Deletion von 4 AS zeigte ein gleiches Spaltbild wie der Wildtyp. Es wurde keine Verschiebung in Richtung des Erkennungsortes beobachtet, wie vorher vermutet. Die Deletion von 7 AS war ähnlich wie bei EcoP15I katalytisch inaktiv. Bei Insertion von mehr als zwei Windungen konnte der Spaltort nur um eine Position verschoben werden. Neben dieser Position spaltete FokI auch an der Position des Wildtyps. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Präferenz der Spaltstelle ähnlich wie bei EcoP15I auf die äußerste Position verlagert hat. Auch die Insertion eines Glycin-Linkers zur Ausbildung unstrukturierter Bereiche zeigt das gleiche Spaltbild. Es besteht also demnach kein direkter Zusammenhang zwischen Erkennungs- und Spaltdomäne. Ein direkter Zusammenhang zwischen Länge des Linkers und Erkennungsort konnte für die Typ I Restriktionsendonukleasen EcoR124 und EcoR124/3 gezeigt werden. Beide Erkennungsorte unterscheiden sich in der Länge des unspezifischen Spacers. EcoR124 erkennt die spezifische DNA-Sequenz 5'-GAA(N₆)RTGG-3' und EcoR124/3 5'-GAA(N₇)RTGG-3', wobei für R= A oder G und N= A, T, G, C gilt. In der Aminosäuresequenz der Linkerregion zwischen beiden Domänen konnte die Sequenzwiederholung (Thr-Ala-Glu-Leu)₂ bei EcoR124 und (Thr-Ala-Glu-Leu)₃ bei EcoR124/3 gefunden werden. Demzufolge wurden bei EcoR124/3 durch die dritte Sequenzwiederholung beide Domänen um 3,4 Å verschoben und um 36° gekippt. Dies führt zu großen strukturellen Änderungen, so dass sich der Erkennungsort veränderte [96]. Bei EcoP15I besteht wie bei FokI kein direkter Zusammenhang zwischen Länge des Linkers und der Spaltstelle. Möglicherweise bestimmen die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den beiden Domänen den Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort [47].

Für weitere genetische Optimierungen des Enzymkomplexes durch Protein-Engineering ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von sehr hohem Wert. Die Interaktion zwischen beiden EcoP15I-Untereinheiten und auch die Interaktion zwischen den einzelnen Domänen der Res-Untereinheit wären verständlicher. Diese Ergebnisse könnten anschließend direkt für ein verbessertes Protein-Engineering genutzt werden.

3.5 Elektronenmikroskopische Darstellung des Enzymkomplexes EcoP15I

In dieser Arbeit sind neben ersten strukturellen Daten über die Restriktionsendonuklease EcoP15I auch vorläufige Daten, die zur Rekonstruktion eines dreidimensionalen Modells führen sollen, beschrieben. Die einzelnen Bilder der Klassendurchschnitte lassen einige Rückschlüsse auf den strukturellen Aufbau von EcoP15I zu. So sind in dem vergrößerten linken Ausschnitt in Abbildung 27 deutlich zwei helle bogenförmige Strukturen zu erkennen. Dies könnten kanalartige Bereiche im Enzym darstellen, mit denen ein Kontakt zur DNA aufgebaut wird. Da die bogenförmige Struktur zweimal zu sehen ist, deutet dies auf einen symmetrischen Komplex hin. Unterhalb dieser Struktur befindet sich ein nicht vollständig symmetrischer Bereich, was aber auch auf eine veränderte Geometrie durch die Negativkontrastierung mit dem Schwermetallsalz Uranylacetat zurückzuführen sein kann. Ein symmetrischer Aufbau kann ebenfalls in dem vergrößerten rechten Ausschnitt in Abbildung 27 gesehen werden. Hier scheinen sich zwei kommaförmige Strukturen gegenüber zu liegen. Welche der beide Untereinheiten zu sehen ist, kann daraus nicht abgeleitet werden. Ein symmetrischer Aufbau würde den bislang postulierten EcoP15I-Komplex aus zwei Mod- und zwei Res-Untereinheiten bestätigen.

3.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sind neue strukturelle und funktionelle Daten der Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I vorgestellt worden. Durch limitierte Proteolyse konnte zum ersten Mal experimentell bewiesen werden, dass die Res-Untereinheit modular aufgebaut ist. Die N-terminale Translokase-Domäne wird von einem 23 Aminosäuren langen Linker von der C-terminalen Endo-Domäne getrennt. Die Mod-Untereinheit dagegen hat einen wenig strukturierten, dynamischen Aufbau. Die Anwendung der „*Combinatorial Domain Hunting*“-Methode könnte diese Ergebnisse zusätzlich bestätigen oder auch erweitern, um eine genauere Vorstellung des strukturellen Aufbaus zu erhalten. Ebenso könnten die identifizierten Domänen in der Res-Untereinheit auf ihre Funktion überprüft werden.

Durch Aminosäureinsertionen in und um den identifizierten Linker herum konnte der Abstand zwischen Erkennungs- und Spaltort für die Hauptspaltpositionen der Mutanten Ch7, Ch11 und Ch18 im Vergleich zum EcoP15I Wildtypenzym vergrößert werden.

Durch weiteres genetisches Protein-Engineering müsste die geschwächte Spaltaktivität dieser Mutanten optimiert werden. Weitere Insertionen in andere Aminosäurebereiche der Res-Untereinheit sind ohne zusätzliche strukturelle Daten nicht sinnvoll. Neben der DNA-Protein-Interaktion müsste die Protein-Protein-Interaktion weiter untersucht werden, um den Einfluss der Mod-Untereinheit auf die Positionen der DNA-Spaltung abzuklären.

Die Vernetzungsstudien von EcoP15I mit spezifischer DNA konnten erstmalig konkrete DNA-Erkennungortsspezifische Protein-Interaktionsstellen einer Typ III Restriktionsendonuklease zeigen. Die Aminosäuren S635 der Mod-Untereinheit, Y248 und K421 der Res-Untereinheit sind an der Bindung zum Phosphatrückgrat der Position A2 des Erkennungsortes beteiligt. Durch weitere Analysen von Vernetzungsprodukten könnte ein Modell der sequenzspezifischen DNA-Bindungsstellen von EcoP15I erstellt werden. Die Untersuchung von Vernetzungsprodukten von EcoP15I mit modifizierten Basen der jeweiligen Spaltpositionen würde einen Einblick in den komplexen Vorgang von DNA-Erkennung und –Spaltung geben. Mit diesen Erkenntnissen könnte ein weiteres Protein-Engineering durchgeführt werden.

Erste Versuche, die zu einem dreidimensionalen Modell der Restriktionsendonuklease EcoP15I führen sollen, haben gezeigt, dass die elektronenmikroskopische Darstellung des 407 kDa großen Enzyms möglich ist. Die ersten Bilder zur Berechnung der initialen Struktur, die als eine Art Matrice für die anschließende Optimierung der Darstellung dient, ermöglichen erste Einblicke in den strukturellen Aufbau von EcoP15I. Dabei wird ein symmetrischer Komplex deutlich, was die postulierte Zusammensetzung aus zwei Mod- und zwei Res-Untereinheiten beweisen würde. Ein dreidimensionales Modell könnte somit aufklären, welchen strukturellen Aufbau der EcoP15I-Enzymkomplex hat, ebenso wie die Stöchiometrie der beiden Untereinheiten. Darüber hinaus würden neue Ansatzstellen für ein Protein-Engineering entstehen, um somit das Ziel der Vergrößerung des Abstandes zwischen Erkennungs- und Spaltort erreichen zu können.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Oligonukleotide

4.1.1 PCR-Primer

Name	Herkunft	Sequenz
MMNNfw	BioTeZ GmbH Berlin-Buch	5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC
MMrev	-“-	5'-GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
Cy5MMNNfw	SIGMA-GENOSYS, Steinheim	5'-Cy5-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC
Cy5MMrev	-“-	5'-Cy5-GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
MutP15/1fw	BioTeZ GmbH Berlin-Buch	5'-CTC ACT TGT TAA AGA GGT CAA CGA
MutP15/2rev	-“-	5'-GCG AGT ATG AAC GCC TGA TTT G
MutP15/3fw	-“-	5' CAT ACT CGC ATT GAT AAA ATT TAC ATC C
MutP15/4rev	-“-	5'-AGC TGA ACG GTC TGG TTA TAG GTA C
MutP15-5rev	-“-	5'-AAA TCG TTC TGT TTC TTC GAG CA
MutP15-6fw	-“-	5'-ACA GAA CGA TTT ACC AAA TCA GG
MutP15-7fw	-“-	5'-CTC GAA GAA ACA GAA CGA TTT ACC
MutP15-8fw	-“-	5'-AAG TCA TTC ATG CTC GAA GAA AC
MutP15-9fw	-“-	5'-AGT GAA TTT TTA TCC ATT TTC AAG TC
MutP15-10rev	-“-	5'-CAG CTC ACT GAA CTT ACC AAC AC
MutP15-11rev	-“-	5'-TAG TTC TTT CAG CTC ACT GAA CTT ACC
MutP15-12fw	-“-	5'-TTC AGT GAG CTG AAA GAA CTA TGG
MutP15-13rev	-“-	5'-GTG GAT GTAAAT TTT ATC AAT GC
MutP15-14rev	SIGMA-GENOSYS, Steinheim	5'-TCG TTC TGT TTC TTC GAG CAT GA
MutP15-15fw	-“-	5'-AGC ATT GTC AGT GAT GAC GAT GAC
MutP15-16fw	SIGMA-GENOSYS, Steinheim	5'-AAA GCG GTG ATT GAG TAC AAA ATA AAC

MutP15-17rev	-“-	5'-TTT CGA CAT TGC CAT ATC ATT GTG GA
MutP15-18fw	-“-	5'-TTT ACC AAA TCA GGC GTT CAT ACT CG
MutP15-19rev	-“-	5'-CAG CTT AGC AAA GTC ATC GTC A
MutP15-20fw	-“-	5'-TTT GCT AAG CTG AAC ACA ATG AGC TA
ΔCh4_rev	-“-	5'-TTC TTC GAG CAT GAA TGA CTT GAA AAT G
ΔCh7_rev	-“-	5'-CAT GAA TGA CTT GAA AAT GGA TAA AAA TTC
beta-Lac_fw	-“-	5'-CAT TGC TAC AGG CAT CGT GG
beta-Lac_rev	-“-	5'-GCA ACA ACG TTG CGC AAA CT
ModS635A_fw	BioTeZ GmbH Berlin-Buch	5'-CTA ATA AAA AAG CTA TTG AGT TAG ATT TGG
ModS635A_rev	-“-	5'-CAT AAC TTT TTA GTG CTT CAT TGA GT
ResY248A_fw	-“-	5'-AAC GCA CAA GCT ATT ATC CGC
ResY248A_rev	-“-	5'-AAA TTT CTC TAT GTT TTC CCA TG
ResK421A_fw	-“-	5'-GAA GCC TGG CGA CCA AAT TCG AAG
ResK421A_rev	-“-	5'-CGG AAA TAT CAT TAC CGT CAC GAT A

4.1.2 Sequenzierprimer

Zur Sequenzierung der mutagenisierten EcoP15I Sequenzen wurden die Primer aus [19] benutzt.

4.1.3 Modifizierte und nicht-modifizierte Oligonukleotide

In der folgenden Auflistung der Oligonukleotide entsprechen die kleingeschriebenen Basen einer Phosphorothioat-Modifizierung. Der EcoP15I-Erkennungsort ist unterstrichen. Die basensubstituierten Oligonukleotide basieren auf der Sequenz von 60-1. Dabei wurden die einzelnen Basen des Erkennungsortes sukzessive mit X (5-Iodo-2'-desoxyuridin) und Y (5-Iodo-2'-desoxycytidin) ausgetauscht (vgl. Tabelle 2)

Name	Herkunft	Sequenz
KW45-1	SIGMA-GENOSYS, Steinheim	5'-ATCGTACCCAGCAGATATCGGTACCGTTTCG GTAATATTCCGACGG
KW45-1c	-“-	komplementär zu KW45-1
PCL-C1	-“-	5'-ATCGTACCCAGCAGATATCGGTACCGTTTCG GTAATATTCCGACGG
PCL-A2	-“-	5'-ATCGTACCCaGCAGATATCGGTACCGTTTCG GTAATATTCCGACGG
PCL-G3	-“-	5'-ATCGTACCCAgCAGATATCGGTACCGTTTCG GTAATATTCCGACGG
PCL-C4	-“-	5'-ATCGTACCCAGcAGATATCGGTACCGTTTCG GTAATATTCCGACGG
PCL-A5	-“-	5'-ATCGTACCCAGCaGATATCGGTACCGTTTCG GTAATATTCCGACGG
PCL-G6	-“-	5'-ATCGTACCCAGCAgATATCGGTACCGTTTCG GTAATATTCCGACGG
60-0	BioTeZ GmbH Berlin-Buch	Sequenz in [97]
60-0c	-“-	komplementär zu 60-0
60-1	-“-	Sequenz in [97]
60-1c	-“-	komplementär zu 60-1
75-2	-“-	Sequenz in [97]
75-2c	-“-	komplementär zu 60-1

4.2 Plasmide

Name	Herkunft	Beschreibung
pUC19	New England Biolabs	
pQEP15	Möncke-Buchner (Berlin)	siehe [19]
pKWCh4	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen 4168-4179
pKWCh7	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen 4159-4179

pKWCh11	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen 4147-4179
pKWCh18	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen 4126-4179
pKWCh29	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen 4093-4179
pKWNh4	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen 4054-4065
pKWNh7	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen 4054-4074
pKW Δ L	diese Arbeit	Basis pQEP15, Deletion der Basen 4177-4245
pKWL23	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen 4177-4245
pKWCh11L3	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen
pKWEndo4	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen
pKWL3	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen
pKWL10	diese Arbeit	Basis pQEP15, Duplikation der Basen
pKW Δ Ch7	diese Arbeit	Basis pQEP15, Deletion der Basen 4159-4179
pKW Δ Ch4	diese Arbeit	Basis pQEP15, Deletion der Basen 4168-4179
pMM71/1	Mücke (Berlin)	Oligonukleotid 71/1 kloniert in SmaI-Ort von pUC19
pMM134/2i	Mücke (Berlin)	Oligonukleotid 134/2i kloniert in SmaI-Ort von pUC19

4.3 Genexpression und Proteinreinigung

Die Wildtyp- und genetisch veränderten EcoP15I-Gene wurden mit einer C-terminalen His₆-Markierung in *Escherichia coli* JM109 Zellen exprimiert. Die Reinigung der Proteine erfolgte wie in [19] beschrieben.

4.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren „in höchster Qualität“ oder in der Qualität „für molekularbiologische Arbeiten“.

4.5 Puffer

Lac-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM Mg(OAc) ₂ ; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTT; 5 µg/ml BSA
Dialysepuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 200 mM NaCl; 7 mM β-Mercaptoethanol oder 1mM DTT; 50 % Glycerin
Sonikationspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 1 M NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol; 10 % Glycerin; 0,1 % Triton X-100
Säulenpuffer A	20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 7 mM β-Mercaptoethanol
Säulenpuffer B	20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 7 mM β-Mercaptoethanol; 1 M NaCl
EMSA-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM Mg(OAc) ₂ ; 10 mM KCl; 100 µg/ml BSA
CL-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA

4.6 Limitierte Proteolyse von EcoP15I

Die Stabilität von EcoP15I gegenüber dem proteolytischen Abbau durch die Protease Trypsin wurde durch verschiedene Testansätze untersucht. Zum einen sollte untersucht werden, wie sich EcoP15I bei unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit Trypsin verhält. Hierzu wurden 133 pmol EcoP15I mit Trypsin im Verhältnis von W_{EcoP15I} zu W_{Trypsin} von 80:1 verdaut. Dieser Zeitverlauf wurde in An- oder Abwesenheit von 625 pmol spezifischer DNA-Duplex 60-2 (Oligonukleotid mit 60 bp Länge mit zwei EcoP15I-Erkennungsorten in inverser Orientierung) bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C untersucht. In einem Gesamtvolumen von 110 µl befanden sich außerdem 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM CaCl₂ und 2 mM ATP. Die Reaktion wurde nach Abnahme von 20 µl als Nullwert durch die Zugabe der Protease Trypsin gestartet. Nach festgelegten Zeitpunkten (fünf, 30, 60 und 150 Minuten) wurde ein Aliquot von 20 µl entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-PAGE Ladepuffer und sofortiger Denaturierung für zehn Minuten bei 98 °C abgestoppt. Zum anderen sollte der Einfluss

des Kofaktors ATP bei Inkubation von EcoP15I mit verschiedenen DNA-Substraten untersucht werden. Hierbei wurden die DNA-Duplexe 60-1 (Oligonukleotid mit 60 bp Länge und einem EcoP15I-Erkennungsort), 75-2 (Oligonukleotid mit 75 bp Länge mit zwei EcoP15I-Erkennungsorten in inverser Orientierung) und 60-0 (Oligonukleotid mit 60 bp Länge ohne EcoP15I-Erkennungsort) verwendet. In einem Reaktionsvolumen von 25 µl befanden sich 32 pmol EcoP15I, 200 pmol der jeweiligen DNA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) und 10 mM CaCl₂. Die Reaktionen wurden jeweils in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung der proteolytischen Fragmente erfolgte in einem 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteinbanden wurden anschließend mit Hilfe von Coomassie Brilliantblau angefärbt und detektiert.

Für die Präparation einzelner proteolytischen Fragmente zur weiteren massenspektrometrischen Analyse wurde die oben stehende Reaktion auf 248 pmol EcoP15I und 1nmol 60-2 vergrößert.

4.7 Präparation der proteolytischen Fragmente und Massenspektrometrie

Die Aufarbeitung der proteolytischen Peptide und die massenspektrometrische Analyse erfolgte am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin. Die individuellen Banden aus der Abbildung 4 wurde mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in 1 mm³ kleine Stücke zerkleinert. Die Stücke wurden anschließend mit 1 ml Acetonitril / 50 mM NH₄HCO₃ (50 : 50) gewaschen. Nachdem der Ansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wurde die Flüssigkeit verworfen. Diese Prozedur wiederholte sich solange, bis die Gelstücke und der Überstand farblos waren. Die Stücke wurden durch Zugabe von Acetonitril 30 Minuten getrocknet, anschließend das Acetonitril abgenommen und die Gelstücke evaporiert. Eine 50 mM NH₄HCO₃ gepufferte Trypsinlösung (12,5 ng/ml, Merck) wurde in einem Verhältnis von 1:20 Trypsin zu Protein zu den Gelstücken gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde gesammelt und die restlichen Gelstücke zweimal mit Acetonitril / 50 mM NH₄HCO₃ (50 : 50) eluiert. Die gesammelten Überstände wurden evaporiert und in deionisiertem Wasser für die anschließende Analyse mit Massenspektrometrie aufgenommen.

Die Experimente der Massenspektrometrie wurden an einem Q-TOF Massenspektrometer (engl.: Quadrupol – Time of flight, Qstar XL, Applied Biosystems) gekoppelt an eine nano-HPLC (Ultimate II, LC Packings) und an einem MALDI-TOF Massenspektrometer (engl.: Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight, Voyager-DE, Applied Biosystems) durchgeführt. Nach Anreicherung der tryptischen Peptide wurden sie durch eine Poroshell 300SB-C18 Säule (5 µm, 150 mm x 75 µm) separiert und mit nano-ESI / MS (Ionenspray Spannung: 1,7 kV, Curtain Gas: 15 a. U., optimierte Spanne der Masse: 350-1500 m/z) und automatisierter MS / MS analysiert. Die MS /MS Daten wurden mit der Mascot-Datenbank abgeglichen. Für die MALDI-TOF Massenspektrometrie (angelegte Spannung: 20 kV, Grid-Spannung: 94 %, Verzögerungszeit 100 ns) wurde α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure als Matrix benutzt. Die einzelnen Spektren wurden aufsummiert.

4.8 Insertionsmutagenese

Die Grundlage aller Mutagenesen stellte das Überexpressionsplasmid pQEP15 dar [19]. Die zwei unterschiedlichen Mutationsstrategien sind in Abbildung 27 dargestellt.

(a) Es wurden zwei PCR-Fragmente generiert, welche die nur einmal im Plasmid schneidenden Restriktionsendonukleasen AflII und NheI (New England Biolabs) enthalten. Die PCR-Fragmente wurden mit den Enzymen gespalten und in einem 1% Agarosegel vom zweiten Spaltprodukt getrennt. Nach Doppelverdau des Überexpressionsplasmid pQEP15 erfolgte die Dephosphorylierung der 5'-Enden und die elektrophoretische Trennung vom zweiten Spaltprodukt. Anschließend wurden der gesplante Vektor mit den beiden PCR-Fragmenten mit Hilfe des Enzyms Ligase zusammengefügt und in die Transformation von *Escherichia coli* JM109 eingesetzt.

(b) Durch die Herstellung von zwei PCR-Fragmenten wurde das gesamte Plasmid vermehrt. Nach Ligation erfolgte die Transformation von *E.coli* JM109. Zur Minimierung des Sequenzieraufwandes wurden pQEP15 und das mutagenisierte Plasmid mit HindIII gespalten und die entsprechenden Fragmente anschließend ligiert. In beiden Fällen wurde der Erfolg der Mutagenese durch die Sequenzierung der PCR-Fragmente überprüft.

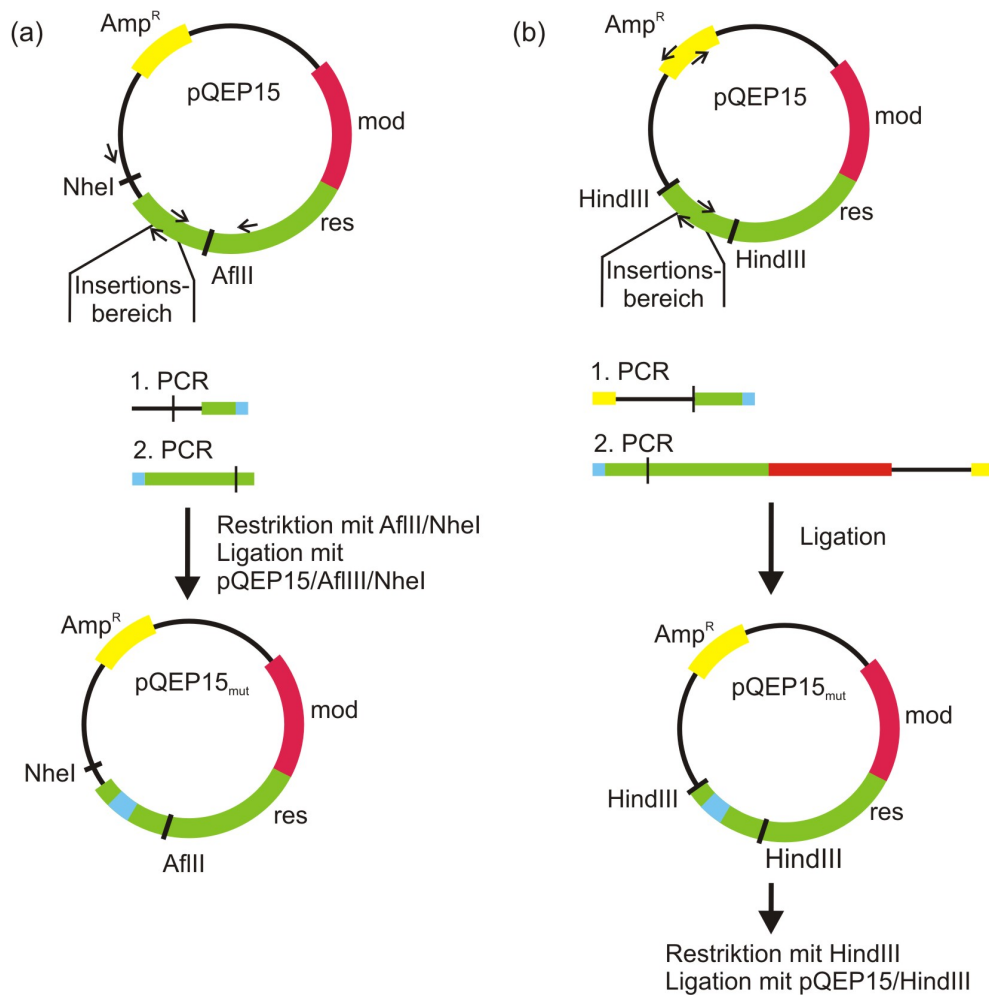


Abbildung 29: Graphische Darstellung der beiden Mutationsstrategien.

Beide Strategien basieren auf dem Überexpressionsplasmid pQEP15. Die Gene mod und res sind als ein roter und grüner Balken dargestellt. Die Ampicillin-Resistenz ist gelb markiert. In (a) werden zwei PCR-Fragmente generiert (1.PCR und 2.PCR), die jeweils die zu verdoppelnde Sequenz enthalten (hellblau). Durch Nutzung der einmal im Plasmid schneidenden Restriktionsenzyme AflIII und NheI werden die PCR-Fragmente anschließend in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Vektor pQEP15 ligiert. In (b) werden mit zwei PCR-Fragmenten das gesamte Plasmid vermehrt. Beide Fragmente beinhalten ebenfalls die zu verdoppelnde Sequenz und einen Teil der Ampicillin-Resistenz. Nach Transformation der ligierten glatten und phosphorylierten Enden der beiden Fragmente erfolgt die Reklonierung in den Ursprungsvektor pQEP15. Hierzu werden beide Plasmide mit HindIII verdaut und die entsprechenden Fragmente wieder ligiert.

4.9 Spaltortbestimmung von EcoP15I und Mutanten

Um mögliche Veränderungen in den Spaltpositionen von EcoP15I-Mutanten feststellen zu können, mussten die genauen Spaltpositionen der Restriktionsendonuklease EcoP15I bestimmt werden. Die Spaltortbestimmung erfolgte anhand eines 281 bp langen PCR-Produkts, welches zwei invers orientierte EcoP15I-Erkennungsorten mit

einem Abstand von 82 bp enthielt. Für die Spaltung wurden 2,5 nM EcoP15I-Erkennungsorte mit 5 nM EcoP15I in Lac-Puffer und 2 mM ATP für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit 96 % Ethanol gefällt. Die Spaltprodukte wurden parallel zu einer Sequenzierung des Substrates auf ein 8% iges denaturierendes Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der Experimentes erfolgte mit dem Programm Fragment Analyzer (Amersham Bioscience).

4.10 Test der Methylierungsaktivität

Die Methylierungsreaktion wurde in Lac-Puffer in Anwesenheit von 2 µM SAM in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Der Ansatz enthielt weiterhin 0,68 pmol EcoP15I Wildtyp- oder genetisch verändertes Enzym und 0,17 pmol HindIII linearisierte pUC19 DNA (= 0,34 pmol EcoP15I Erkennungsorte). Die Inkubation erfolgte für drei Stunden bei 37 °C. Durch anschließende Zugabe von 2 mM ATP und Inkubation für 40 min bei 37 °C wurde die Spaltbarkeit der DNA getestet. Die elektrophoretische Trennung der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte auf einem 0,8 % Agarosegel. Die DNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid visualisiert.

4.11 Test der DNA-Spaltaktivität

EcoP15I Wildtypenzym und genetisch veränderte Enzyme wurden mit 0,17 pmol BamHI oder HindIII linearisierter pUC19 DNA (= 0,34 pmol EcoP15I Erkennungsorte) im Verhältnis von 2:1 Enzym zu Erkennungsorte in Anwesenheit von Lac-Puffer und 2 mM ATP für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl. Die Spaltprodukte wurden auf einem 0,8 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA durch Anfärben mit Ethidiumbromid visualisiert.

4.12 Kolorimetrischer ATPase-Assay

Der Test beruht auf der spektrophotometrischen Quantifizierung eines Phosphomolybdat-Malachitgrün-Komplex. Hierzu wurde eine Malachitgrün-Lösung aus folgenden Komponenten hergestellt: (a) 70 mg Malachitgrün-Oxalat (Sigma-Aldrich) gelöst in 100 ml Reinstwasser; (b) 24,7 g Ammoniummolybdat-Tetrahydrat (Fluka)

gelöst in 500 ml 6 M Salzsäure; (c) 10 g Polyvinylalkohol (M_r 13,000-23,000, Sigma-Aldrich) gelöst in 100 ml kochendem Reinstwasser. Die Komponenten wurden in einem Verhältnis von 1:0,5:0,1 gemischt und mit 0,875 (v/v) Teilen Reinstwasser komplettiert. Dieses Gemisch wurde immer frisch hergestellt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Farbe in ein goldenes Gelb gewandelt hat. Vervollständigt wurde die Arbeitslösung durch Mischung von vier Teilen Malachitgrün-Lösung und einem Teil 30%iger Harnstofflösung. Diese Arbeitslösung wurde direkt vor der Benutzung hergestellt.

Für den ATPase-Assay wurden 14 pmol EcoP15I mit 7 pmol EcoP15I-Erkennungsorte zirkulärer pUC19 Plasmid-DNA in einem Volumen von 280 μ l inkubiert. Im Reaktionsansatz befanden sich ebenfalls 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA und 5 μ g/ml BSA. Nach fünf Minuten Vorinkubation bei 37°C wurden 40 μ l des Reaktionsansatzes als Nullwert abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 240 nmol ATP gestartet. Nach Abnahme einzelner Aliquots von 40 μ l nach 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 50 mM) abgestoppt. Alle Proben wurden bis zum Zeitpunkt der letzten Entnahme auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 1 ml Arbeitslösung zu allen Proben und Inkubation der Ansätze für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei 620 nm in einem Spektrophotometer (Anthos Reader). Die Menge an anorganischem Phosphat konnte anhand einer Standardreihe mit bekannten Pi-Konzentrationen berechnet werden. Die Standardreihe wurde bei jedem Experiment aufgenommen.

4.13 Gel-Shift Experimente

Die Stärke der Interaktion zwischen der Restriktionsendonuklease EcoP15I und DNA kann durch elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays bestimmt werden. Hierzu wurde die Dissoziationskonstante K_D durch DNA-Bindungsversuche experimentell ermittelt. Dafür wurden einzelsträngige DNA-Oligonukleotide mit Hilfe der T4-DNA-Polynukleotidkinase (New England Biolabs) und [γ - ^{32}P] ATP (Hartmann Analytic) am 5'-Ende radioaktiv markiert. Anschließend wurden diese mit den jeweiligen komplementären Strängen zu Oligonukleotidduplexen hybridisiert. Nichteingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit G50-Säulen (Amersham Bioscience) von der markierten DNA getrennt.

Für einen Gel-Shift-Ansatz wurden 5 nM radioaktiv markierte DNA mit 2 mM ATP, 0,1 mM EDTA und ansteigenden Mengen an EcoP15I in EMSA-Puffer und 30 % Glycerin für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Komplexe elektrophoretisch auf einem 4 % Polyacrylamidgel (Gel und Laufpuffer: 20 mM Tris-Acetat, 5 mM CaCl_2) bei einer Spannung von 90 V voneinander getrennt. Die Gele wurden getrocknet, anhängig von der Radioaktivität bis zu 12 Stunden in Imagerplatten exponiert und mit Hilfe des PhosphorImagers (Amersham Bioscience) und der entsprechenden Software ImageQuant (Amersham Bioscience) quantitativ ausgewertet. Die Dissoziationskonstante K_D wurde als der Wert ermittelt, bei dem die Hälfte der DNA im Gel nicht mehr mit ihrer ursprünglichen Geschwindigkeit migriert, dass heißt, zum Beginn der Auftrennung im Gel lag diese DNA nicht in ungebundener Form vor, weshalb angenommen werden kann, dass sie ein EcoP15I-Protein gebunden hat.

4.14 Photochemisches Vernetzen von EcoP15I und DNA

4.14.1 Photochemisches Vernetzen von EcoP15I mit basensubstituierter DNA

Oligodesoxynukleotide wurden mit Hilfe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP und T4-Polynucleotid-Kinase markiert. Der Markierungsansatz wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend die Kinase für 20 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Für die Vernetzungsreaktion wurden 2 μM EcoP15I und 2 μM modifizierter DNA-Duplex in Anwesenheit von 2 mM ATP und 1x Bindungspuffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Belichtung erfolgte mit einem Helium/Cadmium Laser (Laser 2000) für die jeweils angegebene Zeit bei einer Wellenlänge von 325 nm. Die gesamten Reaktionsprodukte wurden auf einem 10 % SDS Proteingel elektrophoretisch aufgetrennt und die im Vernetzungsprodukt befindliche Radioaktivität quantitativ mit einem PhosphorImager gemessen und mit der Software ImageQuant ausgewertet.

4.14.2 Photochemisches Vernetzen von EcoP15I mit Phosphatrückgrat-modifizierter DNA und Aufarbeitung des Peptid-DNA-Komplexes

Die radioaktive Markierung der Oligodesoxynukleotide wurde wie unter 4.14.1 beschrieben durchgeführt.

Vor Durchführung der photochemische Vernetzungsreaktion mussten die an den entsprechenden Positionen mit einem Phosphorothioat modifizierten Oligonukleotide an die photoreaktive Substanz p-APB (Fluka) gekoppelt werden. Das Oligonukleotid wurde dabei für zwei Stunden bei 37 °C mit einer 20 mM p-APB-Methanollösung inkubiert. Die Modifikation des Schwefelatoms erfolgte in einer spontanen Reaktion. Die Umsetzungsreaktion enthielt 50 µl Phosphorothioat-modifiziertes Oligonukleotid in Wasser gelöst (50 pmol), 75 µl 20 mM p-APB in Methanol und 5 µl 1M KH₂PO₄ (pH 7). Sowohl dieser Modifikationsansatz als auch die umgesetzten Oligonukleotide und die p-APB-Stammlösung, die vor jeder Umsetzungsreaktion frisch angesetzt wurde, sollten möglichst ohne Lichteinwirkung durchgeführt werden. Tageslicht führt zum Abreagieren der photoreaktiven Azid-Gruppe. Nach erfolgter Austauschreaktion wurde das Oligonukleotid mit 2,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen 96 % Ethanol gefällt. Die gefällte Nukleinsäure wurde mit 16000 rpm pelletiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets bei 37 °C wurde es in Wasser (HPLC Grade, Roth) aufgenommen und mit equimolaren Mengen an unmodifiziertem Gegenstrang hybridisiert. Die photochemische Vernetzungsreaktion von EcoP15I und der modifizierten DNA erfolgte in einem 200 µl Ansatz mit 50 pmol EcoP15I, 45 pmol unmarkiertem DNA-Substrat, 5,4 pmol [γ -³²P]-markiertes DNA-Substrat und 2 mM ATP in CL-Puffer. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm für zwei Minuten bestrahlt. Für das Kontrollgel des präparativen Ansatzes wurden 1 µl je Reaktionsgefäß entnommen und gesammelt. Die Proben lagerten bei –20 °C bis zur weiteren Bearbeitung. Für den Verdau des präparativen Ansatzes des Photocrosslinking-Komplex wurde die Protease Chymotrypsin im Verhältnis Protease zu Protein von 1:4 eingesetzt. Die Proteolyse erfolgte über Nacht bei 37 °C. Für das Kontrollgel sind ebenfalls 1 µl je Reaktionsgefäß entnommen und gesammelt worden. Alle Ansätze wurden nach erfolgter Proteolyse mit 1/5 Volumen 4 M Lithiumchlorid und 2,5 Volumen eiskalten Ethanol (96 %) über Nacht bei –20°C gefällt. Die gefällten DNA-Oligonukleotid-Duplexe wurden durch Zentrifugation bei 16000 g pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 100 mM Essigsäure. Die Trennung von Peptid und Peptid-DNA wurde mit Hilfe der chromatographischen Methode der Eisen (III)-immobilisierten Metall-

Affinitätschromatographie durchgeführt, beschrieben in [98]. Der pH-Wert der zu ladenden Probe betrug 2,0. Die Eluate wurden in der Speedvac evaporiert.

Die weitere Bearbeitung und die Analyse der Vernetzungsprodukte mittels Massenspektrometrie wurden von Dr. Hildegard Geyer am Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Die DNA in den Peptid-DNA-Fragmenten wurde mittels Flusssäure (HF) über Nacht bei 4°C hydrolysiert. Überschüssige HF wurde durch Stickstoff verdunstet. Nach Lösen des Peptidgemisches in 10 µl Wasser ist 1 µl davon auf ein MALDI-Chip aufgetragen und mit α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure in Ethanol/ Acetonitril/ 0,1 % Trifluoressigsäure (6:3:1, v/v/v) als Matrix überschichtet worden. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer, die Sequenzierung der relevanten Peaks mit einem Tandem MALDI-TOF-MS/MS Gerät. Es wurden 100 bis 200 Einzelspektren, je nach Qualität der Probe, aufsummiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software FlexAnalysis 3.0 und BioTools 3.0 (beide Programme von Bruker).

4.14.3 Mutagenese der putativen Interaktionsstellen

Die Mutationen wurden nacheinander mittels PCR in die ursprüngliche Sequenz des pQEP15-Plasmids eingeführt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Anzucht und Reinigung der Mutante erfolgte wie unter 4.3 beschrieben. In die Vernetzungsversuche wurden 20 pmol EcoP15I oder Mutante, 20 pmol radioaktiv markierter und modifizierter DNA-Oligonukleotid-Duplex PCL-A2 und 1 mM ATP in 1xCL-Puffer eingesetzt. Nach fünf Minuten Inkubation bei RT erfolgte die zweiminütige Belichtung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm. Die Komplexe wurden elektrophoretisch in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach Exposition gegen Imagerplatten im PhosphorImager analysiert.

4.15 Elektronenmikroskopische Darstellung von EcoP15I

Für die elektronenmikroskopische Darstellung von EcoP15I war es wichtig, frische Enzympräparationen zu verwenden (nicht älter als drei Monate). Da enthaltenes Glycerin und β -Mercaptoethanol in der Probe die Elektronenmikroskopie stören, wurde auf eine Dialyse der Proteinfractionen verzichtet. Auf ein mit Chloroform gewaschenes Kupfer-Gitter wurden 3,5 µl einer 20 µg/ml EcoP15I-Lösung aufgetragen. Nach 45 s wurde überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier entfernt. Die Proteine wurden mit 3,5 µl 2 % Uranylacetat für 15 s negativ kontrastiert. Nach Trocknen der Probe wurde die Qualität der Negativ-Kontrastierung im Elektronenmikroskop (Tecnai „Spirit“)

überprüft. Bilder wurden mit einer im Elektronenmikroskop eingebauten CCD-Kamera mit einer 57000 fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Datenverarbeitung erfolgte durch Dr. Jan Giesebrecht am Institut für Med. Physik und Biophysik der Charité Berlin.

LITERATUR

- [1] Bickle, T. A. und Kruger, D. H. (1993): Biology of DNA restriction, *Microbiol.Rev.* 57 [2], Seite 434-450. URL: PM:8336674
- [2] Bertani, G. und Weigle, J. J. (1953): Host controlled variation in bacterial viruses, *J.Bacteriol.* 65 [2], Seite 113-121. URL: PM:13034700
- [3] Arber, W. und Dussoix, D. (1962): Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda, *J.Mol.Biol.* 5, Seite 18-36. URL: PM:13862047
- [4] Dussoix, D. und Arber, W. (1962): Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage lambda, *J.Mol.Biol.* 5, Seite 37-49. URL: PM:13888713
- [5] Wilson, G. G. und Murray, N. E. (1991): Restriction and modification systems, *Annu.Rev.Genet.* 25, Seite 585-627. URL: PM:1812816
- [6] Roberts, R. J.; Belfort, M.; Bestor, T.; Bhagwat, A. S.; Bickle, T. A.; Bitinaite, J.; Blumenthal, R. M.; Degtyarev, S. K.; Dryden, D. T.; Dybvig, K.; Firman, K.; Gromova, E. S.; Gumpert, R. I.; Halford, S. E.; Hattman, S.; Heitman, J.; Hornby, D. P.; Janulaitis, A.; Jeltsch, A.; Josephsen, J.; Kiss, A.; Klaenhammer, T. R.; Kobayashi, I.; Kong, H.; Kruger, D. H.; Lacks, S.; Marinus, M. G.; Miyahara, M.; Morgan, R. D.; Murray, N. E.; Nagaraja, V.; Piekarowicz, A.; Pingoud, A.; Raleigh, E.; Rao, D. N.; Reich, N.; Repin, V. E.; Selker, E. U.; Shaw, P. C.; Stein, D. C.; Stoddard, B. L.; Szybalski, W.; Trautner, T. A.; Van Etten, J. L.; Vitor, J. M.; Wilson, G. G. und Xu, S. Y. (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes, *Nucleic Acids Res.* 31 [7], Seite 1805-1812. URL: PM:12654995
- [7] Murray, N. E. (2000): Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle), *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64 [2], Seite 412-434. URL: PM:10839821
- [8] Bourniquel, A. A. und Bickle, T. A. (2002): Complex restriction enzymes: NTP-driven molecular motors, *Biochimie* 84 [11], Seite 1047-1059. URL: PM:12595133
- [9] Jindrova, E.; Schmid-Nuoffer, S.; Hamburger, F.; Janscak, P. und Bickle, T. A. (2005): On the DNA cleavage mechanism of Type I restriction enzymes, *Nucleic Acids Res.* 33 [6], Seite 1760-1766. URL: PM:15788748
- [10] Dryden, D. T.; Murray, N. E. und Rao, D. N. (2001): Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes, *Nucleic Acids Res.* 29 [18], Seite 3728-3741. URL: PM:11557806
- [11] Janscak, P. und Bickle, T. A. (1998): The DNA recognition subunit of the type IB restriction-modification enzyme EcoAI tolerates circular permutations of its polypeptide chain, *J.Mol.Biol.* 284 [4], Seite 937-948. URL: PM:9837717
- [12] Davies, G. P.; Martin, I.; Sturrock, S. S.; Cronshaw, A.; Murray, N. E. und Dryden, D. T. (1999): On the structure and operation of type I DNA restriction enzymes, *J.Mol.Biol.* 290 [2], Seite 565-579. URL: PM:10390354
- [13] Janscak, P.; Sandmeier, U. und Bickle, T. A. (1999): Single amino acid substitutions in the HsdR subunit of the type IB restriction enzyme EcoAI uncouple the DNA translocation and DNA cleavage activities of the enzyme, *Nucleic Acids Res.* 27 [13], Seite 2638-2643. URL: PM:10373579
- [14] Gorbalenya, A. E. und Koonin, E. V. (1991): Endonuclease (R) subunits of type-I and type-III restriction-modification enzymes contain a helicase-like domain, *FEBS Lett.* 291 [2], Seite 277-281. URL: PM:1657645
- [15] Lagunavicius, A.; Sasnauskas, G.; Halford, S. E. und Siksnys, V. (2003): The metal-independent type IIs restriction enzyme BfiI is a dimer that binds two DNA sites but has only one catalytic centre, *J.Mol.Biol.* 326 [4], Seite 1051-1064. URL: PM:12589753

- [16] Fuxreiter, M. und Simon, I. (2002): Role of stabilization centers in 4 helix bundle proteins, *Proteins* 48 [2], Seite 320-326. URL: PM:12112699
- [17] Pingoud, A.; Fuxreiter, M.; Pingoud, V. und Wende, W. (2005): Type II restriction endonucleases: structure and mechanism, *Cell Mol.Life Sci.* 62 [6], Seite 685-707. URL: PM:15770420
- [18] Iida, S.; Meyer, J.; Bachi, B.; Stalhammar-Carlemalm, M.; Schrickel, S.; Bickle, T. A. und Arber, W. (1983): DNA restriction--modification genes of phage P1 and plasmid p15B. Structure and in vitro transcription, *J.Mol.Biol.* 165 [1], Seite 1-18. URL: PM:6302279
- [19] Moncke-Buchner, E.; Mackeldanz, P.; Kruger, D. H. und Reuter, M. (2004): Overexpression and affinity chromatography purification of the Type III restriction endonuclease EcoP15I for use in transcriptome analysis, *J.Biotechnol.* 19;114 [1-2], Seite 99-106.
- [20] Piekarowicz, A. (1984): Preferential cleavage by restriction endonuclease HinfIII, *Acta Biochim.Pol.* 31 [4], Seite 453-464. URL: PM:6099947
- [21] Piekarowicz, A. (1982): HinfI is an isoschizomer of HinfIII restriction endonuclease, *J.Mol.Biol.* 157 [2], Seite 373-381. URL: PM:6286981
- [22] De Backer, O. und Colson, C. (1991): Identification of the recognition sequence for the M.StyLT1 methyltransferase of *Salmonella typhimurium* LT7: an asymmetric site typical of type-III enzymes, *Gene* 97 [1], Seite 103-107. URL: PM:1995420
- [23] Dartois, V.; De Backer, O. und Colson, C. (1993): Sequence of the *Salmonella typhimurium* StyLT1 restriction-modification genes: homologies with EcoP1 and EcoP15 type-III R-M systems and presence of helicase domains, *Gene* 127 [1], Seite 105-110. URL: PM:8387444
- [24] Su, P.; Im, H.; Hsieh, H.; Kang'A, S. und Dunn, N. W. (1999): LlaFI, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*, *Appl.Environ.Microbiol.* 65 [2], Seite 686-693. URL: PM:9925601
- [25] Hegna, I. K.; Bratland, H. und Kolsto, A. B. (2001): BceS1, a new addition to the type III restriction and modification family, *FEMS Microbiol.Lett.* 202 [2], Seite 189-193. URL: PM:11520613
- [26] Ryan, K. A. und Lo, R. Y. (1999): Characterization of a CACAG pentanucleotide repeat in *Pasteurella haemolytica* and its possible role in modulation of a novel type III restriction-modification system, *Nucleic Acids Res.* 27 [6], Seite 1505-1511. URL: PM:10037813
- [27] Sears, A.; Peakman, L. J.; Wilson, G. G. und Szczelkun, M. D. (2005): Characterization of the Type III restriction endonuclease PstII from *Providencia stuartii*, *Nucleic Acids Res.* 33 [15], Seite 4775-4787. URL: PM:16120967
- [28] Sears, A. und Szczelkun, M. D. (2005): Subunit assembly modulates the activities of the Type III restriction-modification enzyme PstII in vitro, *Nucleic Acids Res.* 33 [15], Seite 4788-4796. URL: PM:16120968
- [29] Humbelin, M.; Suri, B.; Rao, D. N.; Hornby, D. P.; Eberle, H.; Pripfl, T.; Kenel, S. und Bickle, T. A. (1988): Type III DNA restriction and modification systems EcoP1 and EcoP15. Nucleotide sequence of the EcoP1 operon, the EcoP15 mod gene and some EcoP1 mod mutants, *J.Mol.Biol.* 200 [1], Seite 23-29. URL: PM:2837577
- [30] Ahmad, I.; Krishnamurthy, V. und Rao, D. N. (1995): DNA recognition by the EcoP15I and EcoPI modification methyltransferases, *Gene* 157 [1-2], Seite 143-147. URL: PM:7607479
- [31] Janscak, P.; Sandmeier, U.; Szczelkun, M. D. und Bickle, T. A. (2001): Subunit assembly and mode of DNA cleavage of the type III restriction endonucleases EcoP1I and EcoP15I, *J.Mol.Biol.* 306 [3], Seite 417-431.
- [32] Bist, P. und Rao, D. N. (2003): Identification and mutational analysis of Mg²⁺ binding site in EcoP15I DNA methyltransferase: involvement in target base eversion, *J.Biol.Chem.* 278 [43], Seite 41837-41848. URL: PM:12917398

- [33] Meisel, A.; Bickle, T. A.; Kruger, D. H. und Schroeder, C. (1992): Type III restriction enzymes need two inversely oriented recognition sites for DNA cleavage, *Nature* 355 [6359], Seite 467-469. URL: PM:1734285
- [34] Hadi, S. M.; Bachi, B.; Shepherd, J. C.; Yuan, R.; Ineichen, K. und Bickle, T. A. (1979): DNA recognition and cleavage by the EcoP15 restriction endonuclease, *J.Mol.Biol.* 134 [3], Seite 655-666. URL: PM:231671
- [35] Meisel, A.; Kruger, D. H. und Bickle, T. A. (1991): M.EcoP15 methylates the second adenine in its recognition sequence, *Nucleic Acids Res.* 19 [14], Seite 3997. URL: PM:1861989
- [36] Ahmad, I. und Rao, D. N. (1996): Functional analysis of conserved motifs in EcoP15I DNA methyltransferase, *J.Mol.Biol.* 259 [2], Seite 229-240. URL: PM:8656425
- [37] Reddy, Y. V. und Rao, D. N. (1998): Probing the role of cysteine residues in the EcoP15I DNA methyltransferase, *J.Biol.Chem.* 273 [37], Seite 23866-23876. URL: PM:9726999
- [38] Jois, P. S.; Madhu, N. und Rao, D. N. (2008): Role of histidine residues in EcoP15I DNA methyltransferase activity as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis, *Biochem.J.* 410 [3], Seite 543-553. URL: PM:17995451
- [39] Aggarwal, A. K. (1995): Structure and function of restriction endonucleases, *Curr.Opin.Struct.Biol.* 5 [1], Seite 11-19. URL: PM:7773740
- [40] Bist, P.; Madhusoodanan, U. K. und Rao, D. N. (2007): A mutation in the Mod subunit of EcoP15I restriction enzyme converts the DNA methyltransferase to a site-specific endonuclease, *J.Biol.Chem.* 282 [6], Seite 3520-3530. URL: PM:17148461
- [41] Singleton, M. R.; Dillingham, M. S. und Wigley, D. B. (2007): Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases, *Annu.Rev.Biochem.* 76, Seite 23-50. URL: PM:17506634
- [42] Meisel, A.; Mackeldanz, P.; Bickle, T. A.; Kruger, D. H. und Schroeder, C. (1995): Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis, *EMBO J.* 14 [12], Seite 2958-2966. URL: PM:7796821
- [43] Reich, S.; Gossel, I.; Reuter, M.; Rabe, J. P. und Kruger, D. H. (2004): Scanning force microscopy of DNA translocation by the Type III restriction enzyme EcoP15I, *J.Mol.Biol.* 341 [2], Seite 337-343. URL: PM:15276827
- [44] Crampton, N.; Yokokawa, M.; Dryden, D. T.; Edwardson, J. M.; Rao, D. N.; Takeyasu, K.; Yoshimura, S. H. und Henderson, R. M. (2007): Fast-scan atomic force microscopy reveals that the type III restriction enzyme EcoP15I is capable of DNA translocation and looping, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104 [31], Seite 12755-12760. URL: PM:17646654
- [45] Raghavendra, N. K. und Rao, D. N. (2003): Functional cooperation between exonucleases and endonucleases--basis for the evolution of restriction enzymes, *Nucleic Acids Res.* 31 [7], Seite 1888-1896. URL: PM:12655005
- [46] Raghavendra, N. K. und Rao, D. N. (2004): Unidirectional translocation from recognition site and a necessary interaction with DNA end for cleavage by Type III restriction enzyme, *Nucleic Acids Res.* 32 [19], Seite 5703-5711. URL: PM:15501920
- [47] Crampton, N.; Roes, S.; Dryden, D. T.; Rao, D. N.; Edwardson, J. M. und Henderson, R. M. (2007): DNA looping and translocation provide an optimal cleavage mechanism for the type III restriction enzymes, *EMBO J.* 26 [16], Seite 3815-3825. URL: PM:17660745
- [48] Moncke-Buchner, E.; Reich, S.; Mucke, M.; Reuter, M.; Messer, W.; Wanker, E. E. und Kruger, D. H. (2002): Counting CAG repeats in the Huntington's disease gene by restriction endonuclease EcoP15I cleavage, *Nucleic Acids Res.* 30 [16], Seite e83. URL: PM:12177311
- [49] Matsumura, H.; Reich, S.; Ito, A.; Saitoh, H.; Kamoun, S.; Winter, P.; Kahl, G.; Reuter, M.; Kruger, D. H. und Terauchi, R. (2003): Gene expression analysis of plant host-pathogen

- interactions by SuperSAGE, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 [26], Seite 15718-15723. URL: PM:14676315
- [50] Matsumura, H.; Reuter, M.; Kruger, D. H.; Winter, P.; Kahl, G. und Terauchi, R. (2008): SuperSAGE, *Methods Mol.Biol.* 387, Seite 55-70. URL: PM:18287622
- [51] Matsumura, H.; Ito, A.; Saitoh, H.; Winter, P.; Kahl, G.; Reuter, M.; Kruger, D. H. und Terauchi, R. (2005): SuperSAGE, *Cell Microbiol.* 7 [1], Seite 11-18. URL: PM:15617519
- [52] Matsumura, H.; Bin Nasir, K. H.; Yoshida, K.; Ito, A.; Kahl, G.; Kruger, D. H. und Terauchi, R. (2006): SuperSAGE array: the direct use of 26-base-pair transcript tags in oligonucleotide arrays, *Nat.Methods* 3 [6], Seite 469-474. URL: PM:16721381
- [53] Chen, R. (2001): Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution, *Trends Biotechnol.* 19 [1], Seite 13-14. URL: PM:11146097
- [54] Kuchner, O. und Arnold, F. H. (1997): Directed evolution of enzyme catalysts, *Trends Biotechnol.* 15 [12], Seite 523-530. URL: PM:9418307
- [55] Collins, C. H.; Yokobayashi, Y.; Umeno, D. und Arnold, F. H. (2003): Engineering proteins that bind, move, make and break DNA, *Curr.Opin.Biotechnol.* 14 [4], Seite 371-378. URL: PM:12943845
- [56] McClarin, J. A.; Frederick, C. A.; Wang, B. C.; Greene, P.; Boyer, H. W.; Grable, J. und Rosenberg, J. M. (1986): Structure of the DNA-Eco RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution, *Science* 234 [4783], Seite 1526-1541. URL: PM:3024321
- [57] Pingoud, A. und Jeltsch, A. (2001): Structure and function of type II restriction endonucleases, *Nucleic Acids Res.* 29 [18], Seite 3705-3727.
- [58] Alves J. und Vennekohl P. (2004): Protein Engineering of Restriction Enzymes, *Restriction Endonucleases Vol.14*, (Pingoud, A.Ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Seite 393-411.
- [59] Ivanenko, T.; Heitman, J. und Kiss, A. (1998): Mutational analysis of the function of Met137 and Ile197, two amino acids implicated in sequence-specific DNA recognition by the EcoRI endonuclease, *Biol.Chem.* 379 [4-5], Seite 459-465. URL: PM:9628338
- [60] Mukhopadhyay, P. und Roy, K. B. (1998): Protein engineering of BamHI restriction endonuclease: replacement of Cys54 by Ala enhances catalytic activity, *Protein Eng* 11 [10], Seite 931-935. URL: PM:9862213
- [61] Tang, D.; Ando, S.; Takasaki, Y. und Tadano, J. (2000): Mutational analyses of restriction endonuclease-HindIII mutant E86K with higher activity and altered specificity, *Protein Eng* 13 [4], Seite 283-289. URL: PM:10810160
- [62] Seligman, L. M.; Chisholm, K. M.; Chevalier, B. S.; Chadsey, M. S.; Edwards, S. T.; Savage, J. H. und Veillet, A. L. (2002): Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease, *Nucleic Acids Res.* 30 [17], Seite 3870-3879. URL: PM:12202772
- [63] Arnould, S.; Perez, C.; Cabaniols, J. P.; Smith, J.; Gouble, A.; Grizot, S.; Epinat, J. C.; Duclert, A.; Duchateau, P. und Paques, F. (2007): Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells, *J.Mol.Biol.* 371 [1], Seite 49-65. URL: PM:17561112
- [64] Chevalier, B. S.; Kortemme, T.; Chadsey, M. S.; Baker, D.; Monnat, R. J. und Stoddard, B. L. (2002): Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease, *Mol.Cell* 10 [4], Seite 895-905. URL: PM:12419232
- [65] Stryer L.; Berg J.M. und Tymoczko J.L. (2003): Biochemie, 5. Auflage , Spektrum; Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, ISBN: 3-8274-1303-6.
- [66] Laskowski, R. A. und Thornton, J. M. (2008): Understanding the molecular machinery of genetics through 3D structures, *Nat.Rev.Genet.* 9 [2], Seite 141-151. URL: PM:18160966

- [67] Beckmann R. (2002): Kalt erwischt: 3D-Momentaufnahme der Proteintranslokation durch Kryo-Elektronenmikroskopie, *Nachrichten aus der Chemie* 2, Seite 136-141.
- [68] Kim, J. S.; DeGiovanni, A.; Jancarik, J.; Adams, P. D.; Yokota, H.; Kim, R. und Kim, S. H. (2005): Crystal structure of DNA sequence specificity subunit of a type I restriction-modification enzyme and its functional implications, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102 [9], Seite 3248-3253. URL: PM:15728358
- [69] Calisto, B. M.; Pich, O. Q.; Pinol, J.; Fita, I.; Querol, E. und Carpena, X. (2005): Crystal structure of a putative type I restriction-modification S subunit from *Mycoplasma genitalium*, *J.Mol.Biol.* 351 [4], Seite 749-762. URL: PM:16038930
- [70] McClelland, S. E. und Szczelkun, M. D. (2004): The type I and III restriction endonucleases: Structural elements in the molecular motors that process DNA., *Restriction Endonucleases Vol.14*, (Pingoud, A.Ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Seite 111-135.
- [71] Mucke, M.; Reich, S.; Moncke-Buchner, E.; Reuter, M. und Kruger, D. H. (2001): DNA cleavage by type III restriction-modification enzyme EcoP15I is independent of spacer distance between two head to head oriented recognition sites, *J.Mol.Biol.* 312 [4], Seite 687-698.
- [72] Pingoud, V.; Thole, H.; Christ, F.; Grindl, W.; Wende, W. und Pingoud, A. (1999): Photocross-linking of the homing endonuclease PI-SceI to its recognition sequence, *J.Biol.Chem.* 274 [15], Seite 10235-10243. URL: PM:10187809
- [73] Kubareva, E. A.; Thole, H.; Karyagina, A. S.; Oretskaya, T. S.; Pingoud, A. und Pingoud, V. (2000): Identification of a base-specific contact between the restriction endonuclease SsoII and its recognition sequence by photocross-linking, *Nucleic Acids Res.* 28 [5], Seite 1085-1091. URL: PM:10666447
- [74] Wong, D. L. und Reich, N. O. (2000): Identification of tyrosine 204 as the photo-cross-linking site in the DNA-EcoRI DNA methyltransferase complex by electrospray ionization mass spectrometry, *Biochemistry* 39 [50], Seite 15410-15417. URL: PM:11112526
- [75] Willis, M. C.; Hicke, B. J.; Uhlenbeck, O. C.; Cech, T. R. und Koch, T. H. (1993): Photocrosslinking of 5-iodouracil-substituted RNA and DNA to proteins, *Science* 262 [5137], Seite 1255-1257. URL: PM:7694369
- [76] Mucke, M.; Pingoud, V.; Grelle, G.; Kraft, R.; Kruger, D. H. und Reuter, M. (2002): Asymmetric photocross-linking pattern of restriction endonuclease EcoRII to the DNA recognition sequence, *J.Biol.Chem.* 277 [16], Seite 14288-14293. URL: PM:11832480
- [77] Pingoud, V.; Geyer, H.; Geyer, R.; Kubareva, E.; Bujnicki, J. M. und Pingoud, A. (2005): Identification of base-specific contacts in protein-DNA complexes by photocrosslinking and mass spectrometry: a case study using the restriction endonuclease SsoII, *Mol.Biosyst.* 1 [2], Seite 135-141. URL: PM:16880975
- [78] Mayer, A. N. und Barany, F. (1994): Interaction of TaqI endonuclease with the phosphate backbone. Effects of stereospecific phosphate modification, *J.Biol.Chem.* 269 [46], Seite 29067-29076. URL: PM:7961873
- [79] Mayer, A. N. und Barany, F. (1995): Photoaffinity cross-linking of TaqI restriction endonuclease using an aryl azide linked to the phosphate backbone, *Gene* 153 [1], Seite 1-8. URL: PM:7883172
- [80] Christ, F.; Schoettler, S.; Wende, W.; Steuer, S.; Pingoud, A. und Pingoud, V. (1999): The monomeric homing endonuclease PI-SceI has two catalytic centres for cleavage of the two strands of its DNA substrate, *EMBO J.* 18 [24], Seite 6908-6916. URL: PM:10601013
- [81] Christ, F.; Steuer, S.; Thole, H.; Wende, W.; Pingoud, A. und Pingoud, V. (2000): A model for the PI-SceIxDNA complex based on multiple base and phosphate backbone-specific photocross-links, *J.Mol.Biol.* 300 [4], Seite 867-875. URL: PM:10891273

- [82] Yuan, R.; Hamilton, D. L.; Hadi, S. M. und Bickle, T. A. (1980): Role of ATP in the cleavage mechanism of the EcoP15 restriction endonuclease, *J.Mol.Biol.* 144 [4], Seite 501-519. URL: PM:6265647
- [83] Ahmad, I. und Rao, D. N. (1994): Interaction of EcoP15I DNA methyltransferase with oligonucleotides containing the asymmetric sequence 5'-CAGCAG-3', *J.Mol.Biol.* 242 [4], Seite 378-388. URL: PM:7932697
- [84] Reich, S.; Puckey, L. H.; Cheetham, C. L.; Harris, R.; Ali, A. A.; Bhattacharyya, U.; MacLagan, K.; Powell, K. A.; Prodromou, C.; Pearl, L. H.; Driscoll, P. C. und Savva, R. (2006): Combinatorial Domain Hunting: An effective approach for the identification of soluble protein domains adaptable to high-throughput applications, *Protein Sci.* 15 [10], Seite 2356-2365. URL: PM:17008718
- [85] McGuffin, L. J.; Bryson, K. und Jones, D. T. (2000): The PSIPRED protein structure prediction server, *Bioinformatics.* 16 [4], Seite 404-405. URL: PM:10869041
- [86] Dyson, H. J. und Wright, P. E. (2005): Intrinsically unstructured proteins and their functions, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6 [3], Seite 197-208.
- [87] Zhou, H. X. (2003): Quantitative account of the enhanced affinity of two linked scFvs specific for different epitopes on the same antigen, *J.Mol.Biol.* 329 [1], Seite 1-8. URL: PM:12742013
- [88] Laity, J. H.; Dyson, H. J. und Wright, P. E. (2000): DNA-induced alpha-helix capping in conserved linker sequences is a determinant of binding affinity in Cys(2)-His(2) zinc fingers, *J.Mol.Biol.* 295 [4], Seite 719-727. URL: PM:10656784
- [89] Hall, M. C. und Matson, S. W. (1999): Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding, *Mol.Microbiol.* 34 [5], Seite 867-877. URL: PM:10594814
- [90] Chan, S. H.; Bao, Y.; Ciszak, E.; Laget, S. und Xu, S. Y. (2007): Catalytic domain of restriction endonuclease Bmrl as a cleavage module for engineering endonucleases with novel substrate specificities, *Nucleic Acids Res.* 35 [18], Seite 6238-6248. URL: PM:17855396
- [91] Li, L.; Wu, L. P. und Chandrasegaran, S. (1992): Functional domains in Fok I restriction endonuclease, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 [10], Seite 4275-4279. URL: PM:1584761
- [92] Zaremba, M.; Urbanke, C.; Halford, S. E. und Siksnys, V. (2004): Generation of the BfiI restriction endonuclease from the fusion of a DNA recognition domain to a non-specific nuclease from the phospholipase D superfamily, *J.Mol.Biol.* 336 [1], Seite 81-92. URL: PM:14741205
- [93] Wah, D. A.; Hirsch, J. A.; Dorner, L. F.; Schildkraut, I. und Aggarwal, A. K. (1997): Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA, *Nature* 388 [6637], Seite 97-100. URL: PM:9214510
- [94] Li, L. und Chandrasegaran, S. (1993): Alteration of the cleavage distance of Fok I restriction endonuclease by insertion mutagenesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90 [7], Seite 2764-2768.
- [95] Kim, Y. G.; Li, L. und Chandrasegaran, S. (1994): Insertion and deletion mutants of FokI restriction endonuclease, *J.Biol.Chem.* 269 [50], Seite 31978-31982. URL: PM:7989374
- [96] Price, C.; Lingner, J.; Bickle, T. A.; Firman, K. und Glover, S. W. (1989): Basis for changes in DNA recognition by the EcoR124 and EcoR124/3 type I DNA restriction and modification enzymes, *J.Mol.Biol.* 205 [1], Seite 115-125. URL: PM:2784505
- [97] Wagenfuhr, K.; Pieper, S.; Mackeldanz, P.; Linscheid, M.; Kruger, D. H. und Reuter, M. (2007): Structural domains in the type III restriction endonuclease EcoP15I: characterization by limited proteolysis, mass spectrometry and insertional mutagenesis, *J.Mol.Biol.* 366 [1], Seite 93-102. URL: PM:17156795

[98] Stensballe, A.; Andersen, S. und Jensen, O. N. (2001): Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis, *Proteomics*. 1 [2], Seite 207-222. URL: PM:11680868

Abkürzungen

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Cy5	Cyaninfarbstoff 5
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
Fe(III)-IMAC	Eisen (III) -Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
G	Guanin
Mod-Untereinheit	Modifikationsuntereinheit
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p-APB	p-Azidophenacylbromid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
R/M-System	Restriktions- und Modifikationssystem
Res-Untereinheit	Restriktionsuntereinheit
s	Sekunde
SAGE	Serielle Analyse der Genexpression (engl. serial analysis of gene expression)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TRD	Zielerkennungsdomäne (engl. target recognition domain)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der putativen funktionellen Motive in der EcoP15I Mod-Untereinheit.....	12
Abbildung 2: Modell der Spaltung zweier invers zueinander orientierter EcoP15I Erkennungsorte.	14
Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Transkriptomanalyse mittels SuperSAGE. ...	15
Abbildung 4: Tryptischer Verdau von EcoP15I in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von spezifischer DNA (60-2).....	21
Abbildung 5: Einfluss von Kofaktor ATP auf den tryptischen Verdau von EcoP15I in An- und Abwesenheit spezifischer und unspezifischer DNA-Substrate.	22
Abbildung 6: (a) Massenspektrometrische Identifikation der proteolytischen Fragmente und (b) grafische Darstellung ihrer Lage in der EcoP15I-Primärsequenz.	25
Abbildung 7: Übersicht der generierten EcoP15I-Mutanten in der Res-Untereinheit....	28
Abbildung 8: Optimale (links) und nicht-optimale (rechts) DNA-Substrate zur Bestimmung des Spaltortes von EcoP15I.....	29
Abbildung 9: Spaltortbestimmung von EcoP15I anhand der Spaltung von optimalen und nicht-optimalen DNA-Substraten.	31
Abbildung 10: Test der Methylierungsaktivität des EcoP15I Wildtypenzym und der EcoP15I-Mutanten.	33
Abbildung 11: Test der katalytischen Aktivität der EcoP15I-Mutanten.	34
Abbildung 12: SDS-Proteingel der chromatographischen Reinigung der Mutanten Nh4 und Nh7.	35
Abbildung 13: ATP-Hydrolyse des EcoP15I Wildtypenzym und den EcoP15I-Mutanten.	37
Abbildung 14: Zeitverlauf der ATPase-Aktivität von EcoP15I und Mutante Endo4.....	38
Abbildung 15: Spaltortbestimmung der EcoP15I-Mutanten am DNA-Substrat d=82 bp.	40
Abbildung 16: Autoradiographisches Bild (oben) und SDS-PAGE (unten) der Vernetzungsreaktion von EcoP15I mit den jeweiligen basensubstituierten Oligonukleotid-Duplexen.....	44
Abbildung 17: Autoradiographisches Bild der photochemische Vernetzung von EcoP15I mit im Phosphatrückgrat modifizierten, radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid-Duplexe.....	46
Abbildung 18: Zeitverlauf der Vernetzungsreaktion von EcoP15I mit dem im Phosphatrückgrat modifizierten Oligonukleotid-Duplex PCL-A2.	47
Abbildung 19: Autoradiographisches Bild des proteolytischen Verdaus der EcoP15I-DNA-Vernetzungsprodukte mit Trypsin, Chymotrypsin oder Proteinase K.	48

Abbildung 20: Kontrolle des chymotryptischen Verdaus des präparativen EcoP15I-DNA-Vernetzungsansatzes.....	49
Abbildung 21: MALDI-TOF Übersichtsspektrum der EcoP15I-Vernetzungsprodukte, die nach Elution der DNA-Peptide von der Fe(III)-IMAC Säule mit anschließender HF-Behandlung erhalten wurden.....	50
Abbildung 22: Identifizierung der vernetzten Aminosäure von EcoP15I durch Fragmentierung des chymotryptischen Peptids mit dem Wert 1524 m/z mittels MALDI-TOF-MS/MS.....	51
Abbildung 23: Identifizierung der vernetzten Aminosäure von EcoP15I durch Fragmentation des chymotryptischen Peptids mit dem Wert 1042 m/z mittels MALDI-TOF-MS/MS.....	52
Abbildung 24: Identifizierung der vernetzten Aminosäure von EcoP15I durch Fragmentation des chymotryptischen Peptids mit dem Wert 1109 m/z mittels MALDI-TOF-MS/MS.....	53
Abbildung 25: Autoradiographisches Bild der SDS-PAGE und quantitative Auswertung der Vernetzungsreaktion von EcoP15I und der Mutante SYK3A.....	54
Abbildung 26: Ausschnitt eines typischen Mikrographen mit EcoP15I Partikeln.	56
Abbildung 27: Berechnete Klassendurchschnitte der EcoP15I-Partikel.	56
Abbildung 28: Schematische Darstellung der identifizierten Domänen der EcoP15I Mod- und Res-Untereinheit nach Trypsin-Verdau.....	59
Abbildung 29: Graphische Darstellung der beiden Mutationsstrategien.....	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: K_D -Werte von EcoP15I und Mutanten an spezifischer DNA.....	32
Tabelle 2: K_D -Werte und Spaltbarkeit der im EcoP15I DNA-Erkennungsort basensubstituierten Oligonukleotid-Duplexe.	42
Tabelle 3: K_D -Werte der im Phosphatrückgrat modifizierten DNA-Oligonukleotid-Duplexe.....	46

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Detlev H. Krüger und Frau PD Dr. Monika Reuter für die Möglichkeit, dieses Thema am Institut für Virologie der Charité bearbeiten zu dürfen, sowie für die wissenschaftliche Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Anregungen.

Herzlich danken möchte ich auch den Kooperationspartnern, die einige der hier vorgestellten Arbeiten und Ergebnisse erst ermöglichten. Vielen Dank an Dr. Vera Pingoud und Prof. Alfred Pingoud für die Anregungen und Ermöglichung der Durchführung der photochemischen Vernetzungsversuche am Institut für Biochemie der Universität Gießen, wie auch an Dr. Wolfgang Wende für die freundliche Unterstützung und technische Hilfe. Ebenso danke ich Dr. Hildegard Geyer (Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Gießen) für die massenspektrometrische Analyse der Vernetzungsprodukte. Dr. Thorsten Mielke und Jörg Bürger (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) sei gedankt für die Hilfe und Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Prof. Dr. Christian M. T. Spahn und Dr. Jan Giesebrecht (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité Berlin) danke ich für die computergestützte Auswertung der EM-Daten. Bei PD Dr. Axel Hoffmann und Dr. Enno Malguth (Institut für Festkörperphysik, Technische Universität Berlin) bedanke ich mich für die Nutzung des Helium/Cadmium-Lasers.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Reuter. Ich bedanke mich bei Elisabeth Möncke-Buchner, Ursula Scherneck, Petra Mackeldanz, Michal Szczepek und Karol Wyszomirski für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Ratschläge, Unterstützung und Gesprächsbereitschaft.

Ein ganz spezielles Dankeschön geht an alle ehemaligen und derzeitigen „Bewohner“ des Doktorandenzimmers für die vielen wissenschaftlichen und auch privaten Gespräche und Diskussionen, sowie für die sinnvollen Anregungen und die fortwährende Motivation.

Dr. Bertram Hanssum, Dr. Peter Földi, Nina Lütteke und Cindy Gutzeit danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Besonders danke ich Stefan Glaß für seine fortwährende Unterstützung und Motivation, sowie meiner gesamten Familie und allen Freunden.

Eigene Publikationen zum Thema

Artikel

Wagenführ K, Pieper S, Mackeldanz P, Linscheid M, Krüger DH and Reuter M (2007). Structural Domains in the Type III Restriction Endonuclease EcoP15I: Characterization by Limited Proteolysis, Mass Spectrometry and Insertional Mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **366**, 93 – 102

Rothenberg M, Möncke-Buchner E, Reich S, Wagenführ K, Matsumura H, Terauchi R, Krüger DH and Reuter M.

Modulation of the DNA Cleavage Efficiency of Type III Restriction Endonuclease EcoP15I in its Interaction with two Sites in the DNA Target. (eingereicht)

Vortrag

Wagenführ K, Pieper S, Mackeldanz P, Linscheid M, Krüger DH and Reuter M. Characterization of Structural Domains in the Type III Restriction Endonuclease EcoP15I by Limited Proteolysis, Mass Spectrometry and Insertional Mutagenesis. 16th European Students Conference Berlin, Oktober 2007

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Die Typ III Restriktionsendonuklease EcoP15I: Eine Struktur- und Funktions-Analyse“ selbständig verfasst habe und auch in Teilen keine fremden Arbeiten enthalten sind. Teile dieser Arbeit waren bzw. werden Gegenstand eigener Publikationen. Die verwendeten Hilfsmittel und Literatur habe ich vollständig angegeben.

Berlin, September 2008

Katja Wagenführ